



Ноябрь 2022 №1

Системные подходы на службе биологии и физиологии: зачем области нужен ещё один журнал?

М.А. Пантелеев

с. 3-4

Метод пэтч-клемп для изучения ионных каналов активированных тромбоцитов

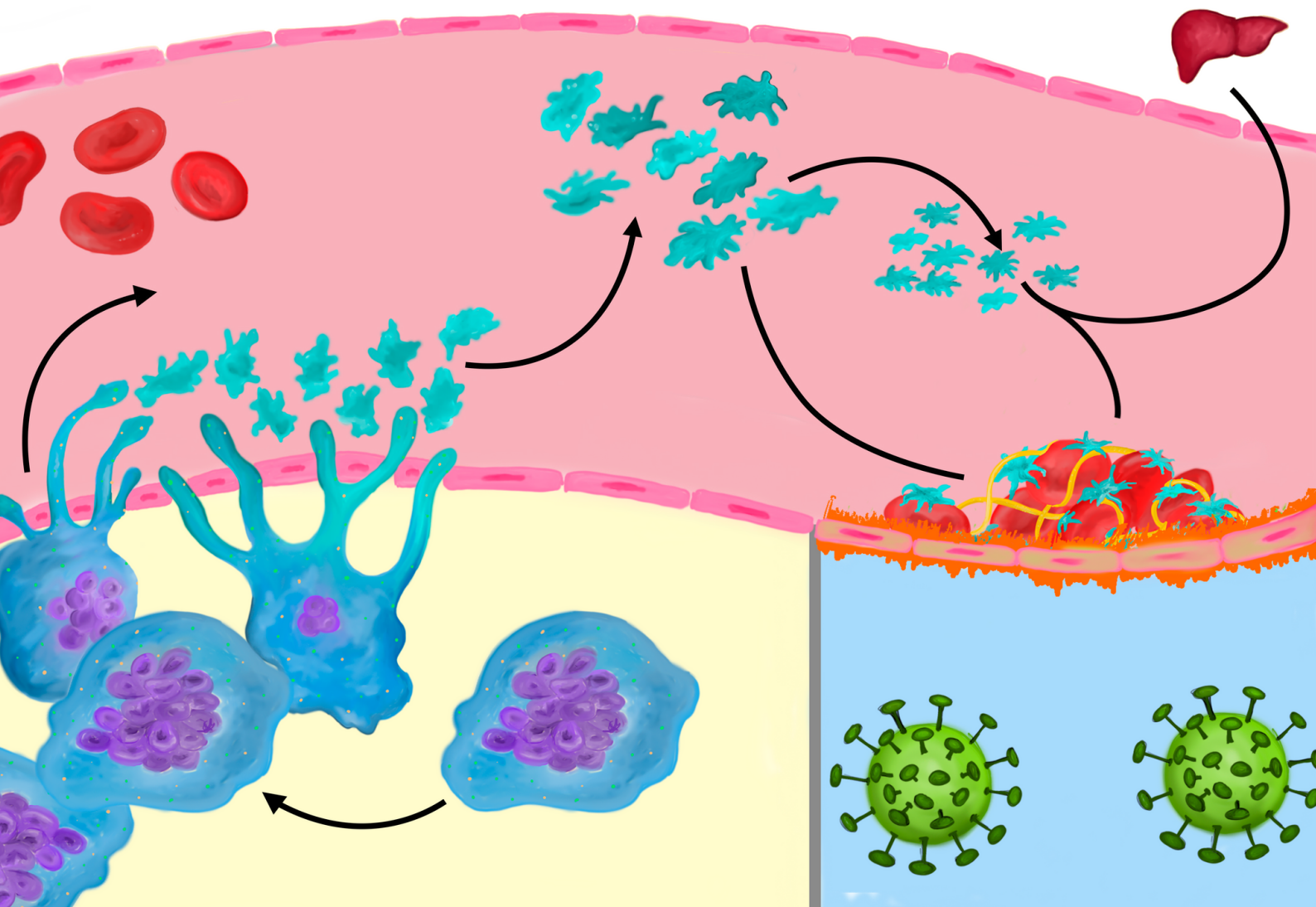
А. Кохан и соавторы

с. 5-13

Существует значимая корреляция между гиперактивацией тромбоцитов и их потреблением при COVID-19. Пилотное исследование на пациентах из больницы ЦКБ РАН (г. Троицк).

М.Г. Степанян и соавторы

с. 39-48



Содержание

1. М.А. Пантелеев Системные подходы на службе биологии и физиологии: зачем области нужен ещё один журнал?.....3
2. А.Ю. Кохан, С.О. Зданевич, И.И. Прокофьев, И.В. Горудко, Е.В. Шамова Метод пэтч-клэмп для изучения ионных каналов активированных тромбоцитов.....5
3. А.Н. Свешникова, М.Г. Степанян и М.А. Пантелеев Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы.....14
4. В.В. Александрова, М.Н. Анисимов, И.А. Ельцов, А.П. Килина, Ю.Н. Лопанская, Л.О. Макарова, М.А. Вовченко, Н.Б. Гудимчук Как избежать ошибок при статистическом анализе биологических экспериментов с помощью простого симулятора многоуровневых данных.....24
5. А.К. Гарсон Дасгупта Прямое взаимодействие STIM1-ORAI1 не может управлять депо-управляемым входом кальция (SOCE) в тромбоцитах.....33
6. М.Г. Степанян, А.А. Мартьянов, О.И. Ан, А.Е. Болдова, С.А. Румянцев, А.Г. Румянцев, М.А. Пантелеев, Ф.И. Атауллаханов и А.Н. Свешникова Существует значимая корреляция между гиперактивацией тромбоцитов и их потреблением при COVID-19. Пилотное исследование на пациентах из больницы ЦКБ РАН (г. Троицк).....39
7. А.К. Табачник Фосфотидилинозитол-содержащие везикулы необходимы для активации PLC ζ в соответствие с предсказанием математической модели.....49
8. А.Е. Асадов, И.К. Чудинов, Д.Ю. Нечипуренко Современные подходы к моделированию тромбоза и гемостаза *in vitro*.....55
9. Анисимов М.Н. *In Vitro* Подходы к визуализации динамики микротрубочек.....66

Выпуск 1 журнала “Системная биология и физиология” (издаётся ЦТП ФХФ РАН с 2022 года)

Периодичность: 4 выпуска в год.

Главный редактор: доктор биологических наук, профессор Пантелеев Михаил Александрович

Системные подходы на службе биологии и физиологии: зачем области нужен ещё один журнал?

М.А. Пантелеев¹⁻³

1. Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии, 109029, Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия
2. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 117997, Саморы Машела 1, Москва, Россия
3. Физический факультет, Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова 119991, Ленинские Горы 1-2, Москва, Россия

Адрес для переписки: editor@sbpreports.ru

Статья

За последние 50 лет биология как наука прошла потрясающий путь, открыв невероятные знания о устройстве живых организмов. Этому пути сопутствовал непрерывный набор огромного количества новой информации о строении живого. В настоящее время происходит внедрение новых системных подходов, которые позволяют дополнить качественное знание наук о природе количественным и механистическим анализом [1]. Уникальные возможности новых синтетических методов, лежащими в основе системной биологии, системной физиологии и системной фармакологии привлекают всё больше и больше учёных [2–6]. Прямо сейчас, это уже большее, нежели простое математическое или компьютерное моделирование биологических систем: разработано множество инструментов, включающих различные подходы, такие как науки о больших данных, современные статистические методы, «омики» и многие другие методы, применяемые для понимания, как функционирует организм в норме и патологии.

С другой стороны, пусть новые системные подходы в биомедицине и являются мощным инструментами, из-за своей междисциплинарной природы они являются сложными для понимания как исследователям, так и читателям. Теоретическая и математическая биология многие годы воспринималась биологами скептически и в настоящее время существует опасность, что и системную биологию ждёт схожая судьба.

Именно поэтому, мы считаем, что соответствующая ниша в мире научных журналов, пусть и не пустует, но и не представлена достаточно ярко и явно. Мы уверены, что существует принципиальная необходимость для более глубокого взаимодействия среди учёных, сфокусированных как на конкретных биологических областях, так и на системных подходах. Создавая новый научный журнал, наша команда в первую очередь хотела бы обратить внимание именно на это.

Читатель может задаться вопросом: «зачем же нам необходим ещё один журнал, посвящённый in

silico исследованиям в науках о жизни?» Безусловно, в данной области уже существует несколько уважаемых и читаемых научных журналов. Однако, статьи по системной биологии, опубликованные в системно-биологических журналах, часто не обладают достаточной научной глубиной в области биологии (независимо от того какая это область). С другой стороны, часто биологи и врачи в целом не обращают внимания на статьи, посвящённые математическому моделированию в этих журналах. Аналогично поступают и все исследователи в целом, если их уровень вовлеченности в математическую биологию недостаточен. Одновременно, экспертиза рецензентов и редакторов профильного биологического журнала может быть недостаточной для корректной оценки работ по системной биологии. Несмотря на это, прикладная математика в биологических науках постепенно завоёвывает всё больше внимания и становится всё более и более ценима аудиторией. Таким образом, становится критически важно понимать все преимущества и недостатки новых методов. Именно поэтому, нашей первой и наиболее важной целью является создание площадки для осмысленных и доступных для понимания дискуссий между физиологами, врачами, биологами, биохимиками и биофизиками, а также математиками.

Наша редакционная коллегия состоит из экспертов в областях физиологии, биологии, математики, иммунологии и, конечно же, системной биологии. Наш научный журнал покрывает такие разделы как самоорганизация на уровне молекул и макромолекулярных комплексов, молекулярные механизмы биологически-значимых реакций, внутриклеточная сигнализация и метаболические сети, регуляция клеточного цикла, экспрессия генов и эпигенетическая регуляция, механизмы физиологических и патофизиологических процессов на уровне клеток, тканей, органов и организмов, фармакологические исследования и диагностика (если они связаны с физиологическими и патологическими механизмами).

Для того, чтобы сделать наш журнал более «дружественным» для авторов, рецензентов и

читателей из разных областей, мы рады представить сразу несколько важных принципов. Во-первых, мы считаем, что наука должна быть свободна от любых границ, а потому, СБФ – Open Access журнал. Более того, мы поддерживаем стремление наших авторов публиковать свои работы на пре-принт серверах для того, чтобы их работы были дополнительно оценены научным сообществом ещё до их публикации. Также, в случае согласия авторов и рецензентов, мы публикуем рецензии на работу и ответы на них одновременно с публикацией самой статьи. На наш взгляд данный принцип позволит сделать науку более прозрачной и открытой. Наконец, мы понимаем, что процесс рецензирования может быть изматывающим и разочаровывающим для всех участников. Поэтому, мы стремимся к применению наиболее прогрессивных схем научного рецензирования. Мы предлагаем двух-стадийную систему оценки статей. Первичная система грубой оценки включает оценивание статьи по стандартизированному набору критериев. На основании полученной оценки, наша система сама предлагает тип рецензии для статьи, а также ограничивает набор возможных пожеланий на второй стадии. Мы уверены, что это позволит снизить количество трудозатрат как рецензентов, так и авторов статей. Наша цель в том, чтобы процесс публикации научных трудов был наполнен энтузиазмом, а не разочарованием и раздражением. Мы также настойчиво рекомендуем авторам предоставлять короткие научно-популярные обзоры при публикации их статей для того, чтобы менее осведомлённая в области системной биологии и фармакологии аудитория лучше могла понять предмет их статьи.

Наконец, мы стремимся к продвижению научного знания и потому СБФ – би-язычный журнал: хотя в настоящий момент наш базовый язык – английский, все опубликованные статьи будут переводиться на русский для того, чтобы снизить порог входа в науку для более молодых научных сотрудников. Другие языки также будут доступны в СБФ по мере роста нашего журнала.

СБФ будет публиковаться поквартально после публикации первого издания в марте. Также мы планируем публиковать и специальные выпуски.

Запуск СБФ – важная веха для нашей команды, и мы воодушевлены и заинтригованы возможностями и трудностями, которые ожидают наше детище. Мы приглашаем других исследователей присоединиться к нам на этом пути, присылая свои лучшие оригинальные исследования и обзоры. Вместе мы окажем неоценимый вклад в развитие системной биологии и физиологии, не ограниченных никакими барьерами.

Искренне Ваш

Главный редактор журнала “Системная биология и физиология”

Профессор Михаил Пантелеев

Благодарности

Автор благодарен Алексею Мартьянов (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва) за ценные дискуссии и советы при подготовке статьи.

Список литературы:

1. Vera J, Lischer C, Nenov M, Nikolov S, Lai X, Eberhardt M. Mathematical Modelling in Biomedicine: A Primer for the Curious and the Skeptic. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22020547>.
2. Garcia E, Ly N, Diep JK, Rao GG. Moving from Point-based Analysis to Systems-based modeling: Integration of Knowledge to Address Antimicrobial Resistance against MDR Bacteria. *Clin Pharmacol Ther* 2021. <https://doi.org/10.1002/cpt.2219>.
3. Geng J, Ji B, Li G, López-Isunza F, Nielsen J. CODY enables quantitatively spatiotemporal predictions on in vivo gut microbial variability induced by diet intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019336118>.
4. Panteleev MA, Andreeva AA, Lobanov AI. Differential Drug Target Selection in Blood Coagulation: What can we get from Computational Systems Biology Models? *Curr Pharm Des* 2020;26:2109–15. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406091807>.
5. Dunster JL, Panteleev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Mathematical Techniques for Understanding Platelet Regulation and the Development of New Pharmacological Approaches. *Methods Mol Biol* 2018;1812:255–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8585-2_15.
6. Belyaev AV, Dunster JL, Gibbins JM, Panteleev MA, Volpert V. Modeling thrombosis in silico: Frontiers, challenges, unresolved problems and milestones. *Phys Life Rev* 2018;26–27:57–95. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2018.02.005>.

Метод пэтч-клэмп для изучения ионных каналов активированных тромбоцитов

А.Ю. Кохан^{1#}, С.О. Зданевич¹, И.И. Прокофьев¹, И.В. Горудко¹, Е.В. Шамова

1. Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

Адрес для переписки: rrchypp@gmail.com

Аннотация

В данной работе рассмотрены существующие и предложены новые подходы к использованию методики пэтч-клэмп для измерения активности одиночных ионных каналов и мембранного потенциала тромбоцитов человека в конфигурации «cell-attached». Проведена регистрация событий открытия и закрытия одиночных каналов тромбоцитов в конфигурации «cell-attached» после активации сильными агонистами: тромбином и иономицином. Экспериментально и теоретически с использованием простых электрических цепей проанализирована возможность измерения мембранного потенциала тромбоцитов в конфигурации «cell-attached», и обнаружена вероятность образования спайков, вызываемых открытиями одиночных каналов, в процессе регистрации мембранного потенциала методом пэтч-клэмп. Описан простой способ получения конфигурации «inside-out», а также получены записи токов через кальций-управляемые одиночные ионные каналы. В целом в данной работе предложены новые подходы для дальнейшего изучения роли ионных каналов и мембранного потенциала в физиологическом и патофизиологическом отклике тромбоцитов.

Ключевые слова: тромбоциты, пэтч-клэмп, мембранный потенциал, ионный канал

Введение

Тромбоциты млекопитающих представляют собой маленькие безъядерные клетки, играющие ключевую роль в процессах гемостаза и тромбообразования. За несколько последних десятилетий было установлено, что ионные каналы и мембранный потенциал играют важнейшую роль в физиологических и патофизиологических функциях тромбоцитов. До разработки метода пэтч-клэмп исследователи использовали флуоресцентные потенциал-чувствительные зонды [1-3] и радиоактивные изотопы [4-7] для изучения ионной проводимости мембран клеток и измерения мембранного потенциала. С появлением метода пэтч-клэмп

[8, 9] стало возможным напрямую измерять проводимость одиночных ионных каналов или целой мембраны клеток, а также точно измерять значение мембранного потенциала даже таких маленьких клеток как тромбоциты.

Пэтч-клэмп – метод электрофизиологии, который позволяет измерять ионные токи, проходящие через одиночные каналы, фиксируя потенциал на изолированном участке клеточной мембраны (или же целой клетки). Существует несколько конфигураций данного метода. Установление гигаомного контакта между пипеткой и клеточной мембраной позволяет реализовать конфигурацию «cell-attached», в которой возможно измерение ионных токов через одиночные каналы под пипеткой. Если порвать участок мембраны под пипеткой, то мы получим конфигурацию «whole cell», в которой можно измерять как токи от всей мембраны, так и кинетику мембранного потенциала. Другие широко используемые конфигурации пэтч-клэмп – «inside-out» и «outside-out», в которых либо внутренняя, либо внешняя поверхность куска мембраны под пипеткой омывается внеклеточным раствором.

Применение методики пэтч-клэмп к исследованию тромбоцитов пролило свет на различные механизмы их функциональной активности. Например, было показано, что самыми многочисленными ионными каналами на плазматической мембране тромбоцитов являются потенциал-управляемые калиевые каналы K_v 1.3, играющие ключевую роль в поддержании потенциала покоя [10, 11]. С помощью пэтч-клэмп был идентифицирован кальций-управляемый канал K_{Ca} на мембране тромбоцитов, а также установлена его роль в поддержании движущей силы для ионов кальция в процессе активации клеток [12]. Более того, с помощью данного метода был установлен ряд важных модуляторов кальциевой сигнализации в тромбоцитах и мегакариоцитах: рецептор-управляемый катионный канал P2X [13, 14], а также кальциевый канал $Orai-1$, активируемый высвобождением кальция из внутриклеточных компартментов [15-17].

Для цитирования: Кохан А.Ю. и соавт; СБФ 2022; 1 (1) pp. 5-13

Одно из важнейших применений метода пэтч-клэмп – измерение мембранного потенциала. Ранние исследования с применением флуоресцентных зондов показали, что активация тромбоцитов приводит к различным изменениям мембранного потенциала в зависимости от типа агониста. Так, активация тромбоцитов тромбином (в концентрации более 0.1 ед/мл) приводила к деполяризации мембраны, тогда как АДФ (0.3 – 30 мкМ) вызывал гиперполяризацию с дальнейшей деполяризацией мембраны клеток [18]. Более поздние эксперименты с применением пэтч-клэмп показали, что мембранный потенциал мегакариоцитов и, возможно, тромбоцитов может осциллировать после активации клеток АДФ [19, 20]. Более того, изменения мембранного потенциала мегакариоцитов могут напрямую модулировать внутриклеточные кальциевые осцилляции [20]. Так же имеются данные о непосредственном управлении мембранным потенциалом рецепторов связанных с G-белками [21, 22].

Анализ транскриптома тромбоцитов [23], а также другие недавние исследования по изучению тромбоцитов и мегакариоцитов [24] свидетельствуют о наличии в тромбоцитах ранее не идентифицированных ионных каналов. Таким образом, применение метода пэтч-клэмп к тромбоцитам представляет огромный интерес для понимания механизмов, лежащих в основе многих функций этих маленьких клеток.

Несмотря на все преимущества метода пэтч-клэмп, существует множество ограничений для его применения на тромбоцитах. Из-за малых размеров данных клеток и их лабильности некоторые из разработанных конфигураций пэтч-клэмп невозможно применить на тромбоцитах. Например, на данный момент нет опубликованных экспериментальных данных, свидетельствующих о возможности реализации конфигурации «outside-out» на тромбоцитах. Существует мнение, что в данной конфигурации вообще нет необходимости, так как конфигурация «whole-cell» для тромбоцитов ей, по сути, и является [25]. Стоит отметить, что получение конфигурации «whole-cell» также является сложной задачей, и часто ведет к нарушению гигаомного контакта. Некоторые литературные данные свидетельствуют о том, что облегчить получение данной конфигурации можно, добавив в пипеточный раствор, не содержащий ионов кальция, АТФ [10]. Более перспективным способом является использование нистатина (метод «перфорированного пэтча») [13], однако данный подход также имеет ряд ограничений.

Трудности в работе с тромбоцитами, их лабильность и малый размер привели

к использованию мегакариоцитов и соответствующих клеточных линий в качестве модельных клеток в экспериментах пэтч-клэмп вместо тромбоцитов [26, 27]. С одной стороны, это позволяет получать результаты, которые ранее на тромбоцитах было получить проблематично. Но с другой стороны, несмотря на схожесть рецепторного профиля, основных путей сигнализации и ионных каналов тромбоцитов и мегакариоцитов, нельзя быть абсолютно уверенным, что полученные с использованием мегакариоцитов результаты могут быть напрямую перенесены на тромбоциты.

Поэтому целью данной работы стал анализ проблем и ограничений в применении метода пэтч-клэмп на тромбоцитах, поиск потенциальных способов решения данных проблем, а также демонстрация возможностей предложенного в данной работе подхода для изучения токов одиночных каналов в процессе активации тромбоцитов.

Материалы и Методы

Реагенты

Цитрат натрия, HEPES, АДФ, глюкоза, иономицин и апираза были приобретены в Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). PGI₂ был получен в Santa Cruz (Dallas, USA).

Растворы

Внеклеточный буферный раствор с превалирующим содержанием NaCl (внеклеточный буферный раствор) содержал 150 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, pH 7.35 (титрование проводилось с помощью NaOH). Пипеточный раствор с превалирующим содержанием KCl (пипеточный буферный раствор) содержал 150 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, pH 7.2 (титрование проводилось с помощью KOH). В экспериментах с заменой ионного состава, в пипеточном растворе KCl был заменен эквимольным количеством NaCl. Осмолярность растворов была доведена до 300 мОсм для внеклеточного раствора и до 270 мОсм для пипеточного раствора при помощи воды 3-ей степени очистки (MilliQ). Все растворы были профильтрованы через шприцевой фильтр (0.22 мкм).

Выделение клеток

Венозную донорскую кровь собирали в пробирки объемом 10 мл, содержащие 3.8 % (w/v) цитрата натрия (в соотношении 9 к 1), 0.5 мкМ PGI₂, 0.3 ед/мл апиразы, и затем центрифугировали при 100 g в течение 7 минут. Далее, 250 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы смешивали с

1.25 мл внеклеточного раствора, 0.5 мл цитрата натрия (pH 5.5), 0.5 мкМ PGI_2 , 0.3 ед/мл апиразы и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали внеклеточным буферным раствором с превалирующим содержанием NaCl. Все действия выполнялись в соответствии с Хельсинской Декларацией.

Пипетки для пэтч-клэмп

Пипетки для пэтч-клэмп изготавливали из покрытого филаментом боросиликатного стекла (внутренний диаметр 0.86 мм, внешний диаметр 1.5 мм) (НЕКА Instruments) на пуллере Sutter Instruments Brown P-97. Полировка пипеток производилась нагреванием на том же пуллере в соответствие с рекомендациями изготовителя. Сопротивление заполненных раствором пипеток составляло 7-15 МОм.

Электрофизиологические измерения

Запись в конфигурациях «whole-cell» и «inside-out» проводилась с использованием усилителя НЕКА EPS8 (НЕКА Elektronik GmbH) в режимах фиксации тока и фиксации потенциала. Так как целью экспериментов было изучение одиночных каналов, компенсация последовательного сопротивления или диффузионного потенциала не проводилась. Чашка Петри с внеклеточным раствором была заземлена напрямую через хлорсеребряный электрод, помещенный в стороне от клеток. Перемещение пипетки осуществлялось при помощи манипулятора Sutter MP-225. Чашка Петри располагалась на столике микроскопа (Olympus IX51WI, Токуо, Japan) с общим увеличением 400x. Фильтрация данных производилась с помощью встроенного фильтра Бесселя нижних частот при 0.7 кГц, оцифровка данных производилась на компьютере при помощи ЦАП/АЦП В-381. Запись данных на жесткий диск осуществлялась с частотой 1 кГц с использованием написанной на Matlab 2004 (The MathWorks, Inc.) программы. Полученные данные анализировались с помощью Origin 8.1 (Origin Lab, Northampton, Massachusetts, USA), WinEDR v. 3.9.1 (University of Strathclyde) и Spectragryph Software (F. Menges "Spekwin32-optical spectroscopy software", Version 1.2.14, 2020, <http://www.ffmpeg2.de/spekwin/>).

Активация клеток

Для того чтобы избежать преждевременной активации тромбоцитов во время их контакта со стеклянной пипеткой, процесс образования гигаомного контакта проводился во внеклеточном буферном растворе с превалирующим содержанием NaCl в отсутствие Ca^{2+} . После этого, 100 мкл внеклеточного раствора, содержащего CaCl_2 и агонист вносили в чашку Петри (конечная

концентрация CaCl_2 в чашке составляла 2 мМ, если другое не указано).

Результаты и Обсуждение

Стеклянные пипетки и электронный шум

Обычно для клеток небольшого размера рекомендуется использовать толстостенные капилляры для изготовления пипеток (например, внутренний диаметр 0.86 мм, внешний диаметр 1.5 мм) [28]. Теоретически можно использовать и тонкостенные капилляры, однако в этом случае процесс изготовления пипеток с маленькой апертурой, подходящей для тромбоцитов, окажется намного сложнее. При использовании толстостенных пипеток имеется ряд трудностей, главной из которых является повышенный уровень электронного шума, который появляется из-за диэлектрических свойств стекла [8]. Так как большинство токов от одиночных каналов имеют амплитуду в диапазоне 0.5 – 2 пА, повышенный уровень шумов может скрыть данные события. В некоторых исследованиях с применением пэтч-клэмп для уменьшения уровня шумов используют методику покрытия кончика пипетки специальным силиконовым эластомером «Sylgard», что позволяет уменьшить емкость пипетки [9]. Однако в наших исследованиях необходимыми и достаточными условиями для записи одиночных ионных каналов с амплитудами вплоть до 0.4 – 0.5 пА, а в некоторых случаях и ниже, были: корректное заземление всего оборудования, включая клетку Фарадея, сопротивление контакта более 20 ГОм и коэффициент усиления на усилителе 100 мВ/пА или выше.

Получение гигаомного контакта

2 мкл суспензии тромбоцитов помещали на дно пластиковой чашки Петри, изготовленной из 12-луночного планшета для клеточных культур, заполненной 700 мкл внеклеточного буферного раствора с превалирующим содержанием NaCl, содержащего 1 мМ MgCl_2 (в отсутствие Ca^{e}). Ожидали пока клетки осядут на дно чашки. Далее с помощью микроманипулятора стеклянную пипетку помещали на высоте 1-2 мм от дна чашки. После этого иммерсионный объектив 40x опускали в раствор, и фокусировались на кончик пипетки. Для измерений выбирали только плавающие клетки.

Процент удачно реализованных плотных контактов с клеткой зависит от нескольких факторов. Во-первых, кончик пипетки всегда должен быть чистым, поэтому мы изготавливали пипетки только перед использованием. Во-вторых, внеклеточный и пипеточный растворы всегда должны быть профильтрованы. Другими важными факторами для образования успешного

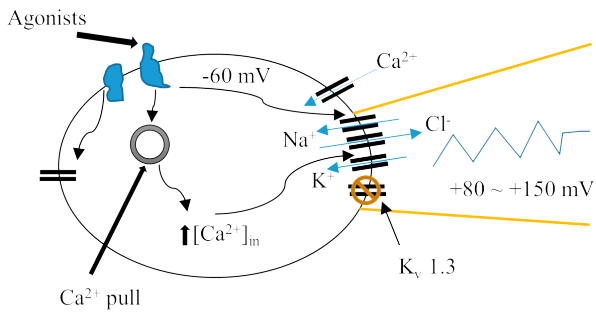


Рисунок 1. Схематическая иллюстрация регистрации токов от одиночных ионных каналов тромбоцитов во время их активации, исключающая открытие каналов $K_v 1.3$

гигаомного контакта являются наличие дивалентных ионов (кальция и магния) в пипеточном растворе и разница в осмолярности между пипеточным и внеклеточным буферными растворами примерно в 10 % (30 мОсм), как было предложено Неером и Закманом в их новаторской работе [9]. Ранее было показано как теоретически, так и в экспериментах с модельными мембранами, что дивалентные ионы значительно усиливают контакт между мембраной и стеклом капилляра [29]. Еще один важный параметр – это уровень pH в пипеточном буферном растворе, так как ионы H^+ , наравне с Ca^{2+} и Mg^{2+} , увеличивают силу адгезии клеточной мембраны к стеклу. После учета и применения всех вышеназванных подходов, процент успешных гигаомных контактов возрос до 90 %. Хотя стабильность контактов клетки с пипеткой различалась, обычно удавалось получать успешные гигаомные контакты в течение 5 часов после выделения клеток.

Конфигурация «cell-attach» для тромбоцитов

Из-за маленьких размеров тромбоцитов и вышеназванных проблем лишь немного типов каналов мембраны тромбоцитов были описаны с использованием метода пэтч-клэмп, включая $K_{Ca} 3.1$, $K_v 1.3$, P_2X , хлорные каналы. Однако недавние исследования [23] свидетельствуют о том, что несмотря на свой маленький размер и отсутствие ядра, тромбоциты имеют огромное разнообразие ионных каналов, которые на данный момент охарактеризованы недостаточно. Кроме того, некоторые из ранее перечисленных результатов были получены с использованием мегакариоцитов, не тромбоцитов. Поэтому идентификация ионных каналов мембраны тромбоцитов и описание их электрофизиологических характеристик важно для расширения понимания их роли в процессах внутриклеточной сигнализации и физиологическом ответе [22, 30-36].

Измерение ионных токов от одиночных каналов при активации тромбоцитов

Ранее было показано, что тромбоциты имеют большое количество (300-400 шт на клетку)

потенциал-управляемых калиевых каналов $K_v 1.3$ [37]. Учитывая площадь мембраны тромбоцитов и размер апертуры пипетки, как минимум несколько каналов данного типа всегда будут присутствовать в куске мембраны под пипеткой и вносить вклад в регистрируемые токи, что значительно осложняет детектирование токов от других типов каналов. Учитывая имеющиеся биофизические характеристики K_v каналов, а именно потенциал 50%- активации, равный -30 мВ, мы предложили подход, позволяющий измерять активность других типов ионных каналов. Использование конфигурации «cell-attach» в режиме фиксации потенциала с приложенным потенциалом в диапазоне от $+80$ до $+150$ мВ на электроде внутри пипетки позволило избежать активации потенциал-управляемых каналов и сделало возможным регистрацию токов от всех остальных ионных каналов. Во время данной процедуры кусок мембраны под пипеткой был гиперполяризован, что приводило к инактивации каналов $K_v 1.3$. Вместе с тем, фиксируемая разность потенциалов создавала достаточную движущую силу для всех типов ионов, что облегчало регистрацию токов с очень низкой проводимостью в районе 1-2 пСм. Схематическая иллюстрация данного подхода изображена на рис. 1.

Вышеназванные подходы для получения хорошего гигаомного контакта позволили нам записать ионные токи от одиночных каналов тромбоцитов, активированных тромбином (0.73 мкг/мл) и иономицином (1 мкМ) в конфигурации «cell-attached» (рис. 2А, В, С).

Анализ данных, полученных при 6 успешно реализованных гигаомных контактах позволил установить, как минимум 5 различных типов проводимостей в активированных тромбоцитах в диапазоне от 2 до 20 пСм. Учитывая, что большинство известных и описанных ранее ионных каналов имеют низкую проводимость, кинетические кривые ионных токов с низким приложенным потенциалам давали мало результата. Когда приложенный потенциал составлял $+50$ мВ, амплитуда регистрируемых токов от одиночных каналов находилась в диапазоне 0.4 – 0.5 пА, что лишь немногим больше уровня электронных шумов (рис. 2А). Поэтому, фиксация потенциала в диапазоне значений $+80$ – $+150$ мВ позволяет выявить токи от каналов с самой низкой проводимостью. Однако, следует иметь ввиду, что большие приложенные потенциалы могут приводить к достаточно быстрому нарушению гигаомного контакта.

На рис. 2В, как и на рис. 2А приведены аналогичные кинетики токов, активируемых тромбином, но с использованием пипеточного

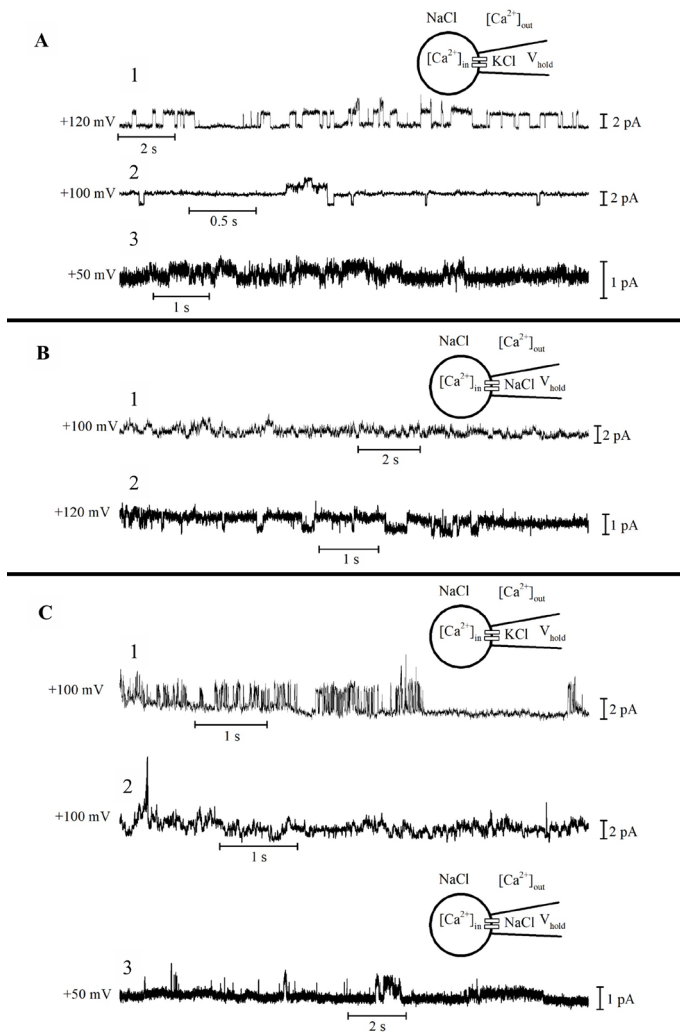


Рисунок 2. Записи токов от одиночных каналов тромбоцитов в конфигурации «cell-attached». А, В Активация тромбоцитов тромбином (0.73 мкг/мл) во внеклеточном буферном растворе с превалирующим содержанием NaCl. Пипеточный буферный раствор с превалирующим содержанием KCl. (А), пипеточный буферный раствор с превалирующим содержанием NaCl (В). С, Активация тромбоцитов иономицином (1 мкМ) во внеклеточном буферном растворе с превалирующим содержанием NaCl. 1,2 - Пипеточный буферный раствор с превалирующим содержанием KCl, 3 – пипеточный буферный раствор с превалирующим содержанием NaCl. Приложенный потенциал (V_{hold}) указан слева от каждой кинетики тока. Представлены типичные кинетические кривые из 15 независимых экспериментов с использованием тромбоцитов разных доноров. donors are presented.

раствора с превалирующим содержанием NaCl. Из представленных данных видно, что некоторые типы событий (оценивали по амплитуде токов при определенном фиксированном потенциале), которые наблюдались при использовании пипеточного раствора с превалирующим содержанием KCl (рис. 2А), не наблюдались, когда пипеточный буферный раствор был с превалирующим содержанием NaCl (рис. 2В), что может свидетельствовать об участии как минимум 2 типов каналов калиевой проводимости в процессе активации тромбоцитов тромбином.

Для тестирования стабильности гигаомного контакта клетки со стеклянной пипеткой,

получаемого с помощью предложенного в данной работе подхода, производили запись токов от одиночных каналов тромбоцитов в ответ на действие 1 мкМ иономицина, Ca^{2+} -ионофора, обладающего сильным активирующим действием на тромбоциты. Результаты этих экспериментов с применением разных пипеточных растворов приведены на рис. 2С.

Значительное увеличение уровня внутриклеточного кальция, индуцируемое иономицином, или же сочетанным действием коллагена и тромбина, обычно переводит тромбоциты в новое прокоагулянтное состояние [38]. Во время этого перехода, морфология клеток значительно меняется. Они становятся шароподобными [39], многие белки плазматической мембраны, а также фосфатидилсерин, переходят в так называемую «кэп»-область [40, 41]. На микрофотографиях (рис. S1 и S2, дополнительные материалы) можно видеть тромбоциты на пипетке или свободно плавающие в растворе до и после активации. Не смотря на сильную активацию и переход в прокоагулянтное состояние, нарушение гигаомного контакта после внесения иономицина наблюдалось лишь в 30% пэтчах.

Ионные каналы играют важную роль во множестве процессов, лежащих в основе активации тромбоцитов. Например, калиевые каналы участвуют в кальциевой сигнализации, поддерживая мембранный потенциал, и таким образом увеличивая движущую силу для Ca^{2+} . Вход кальция во время активации также зависит от работы ряда ионных каналов, включая Orai1, P2X, TRPC [17, 27, 42]. Важно отметить, что скрамблаза Ано6, которая играет решающую роль в прокоагулянтном ответе тромбоцитов, также является каналом для ионов хлора с очень большим порогом активации ионами кальция [33, 43] и может вносить вклад в активацию тромбоцитов и их переход в прокоагулянтное состояние. Таким образом, предложенные в данной работе подходы для регистрации токов от одиночных каналов могут стать полезным инструментом для изучения различных сигнальных путей тромбоцитов, в которых ключевую роль играют ионные каналы.

Измерение мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached»

Ранее в работе Mason J. et. al. [19], был предложен новый подход для изучения мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached». Согласно модельным экспериментам и данным пэтч-клэмп, точность записи потенциала в режиме фиксации тока зависит от отношения между сопротивлением контакта и входным сопротивлением мембраны, а также от ионного состава раствора в пипетке, так как он должен быть

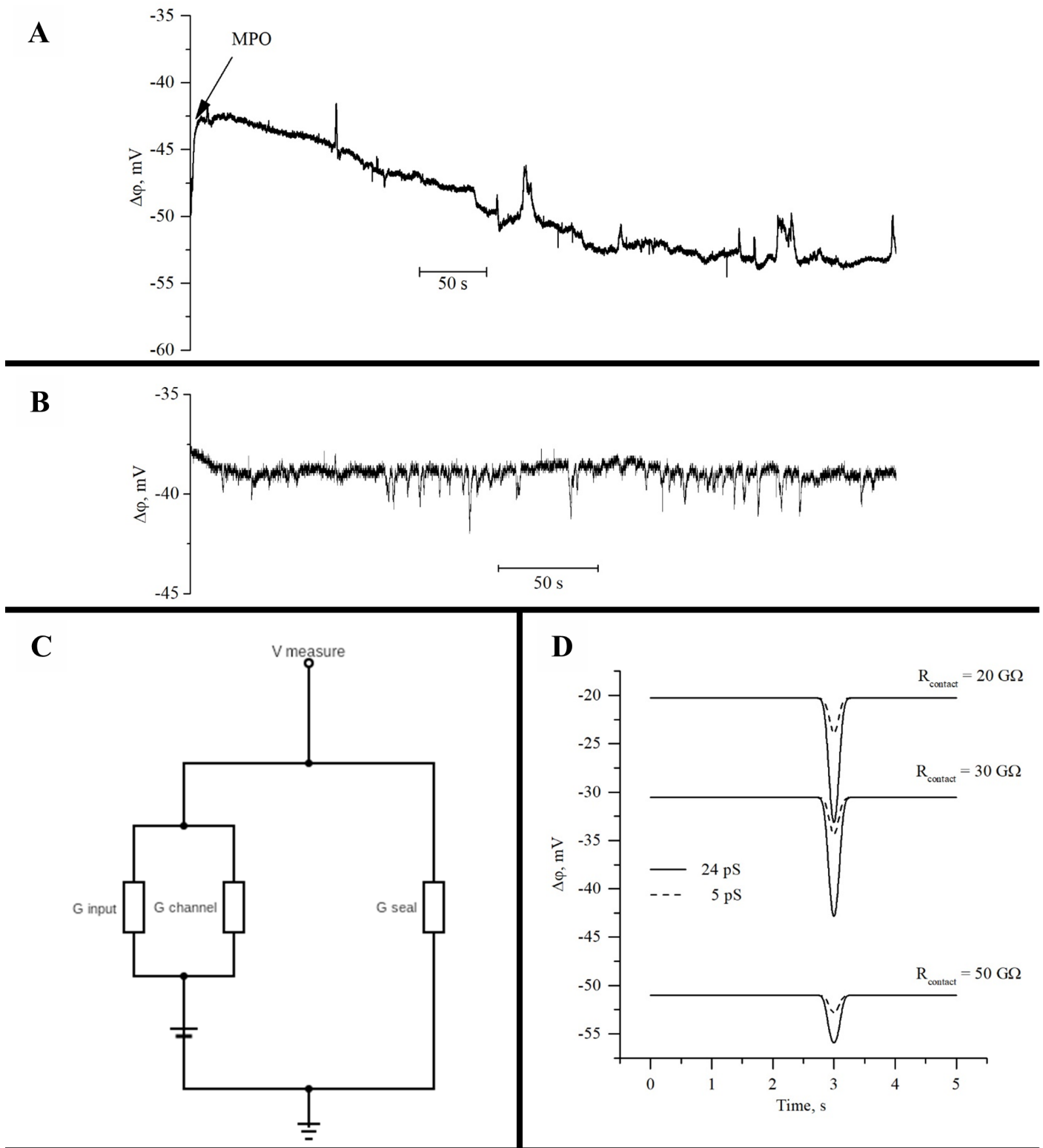


Рисунок 3. Изменение мембранного потенциала тромбоцитов. А, Измерение мембранного потенциала тромбоцитов после активации 100 нМ МПО было проведено в конфигурации «cell-attached» в режиме фиксации тока. Представлена типичная кинетическая кривая из 15 независимых экспериментов на крови от разных доноров. В, Кинетика мембранного потенциала тромбоцитов, записанная в конфигурации «cell-attached», после активации 1 мкМ АДФ. Можно увидеть небольшие осцилляции мембранного потенциала на уровне 7-10 мВ. Представлены типичные кинетические кривые из 10 независимых экспериментов с использованием тромбоцитов разных доноров. С, Упрощенная электрическая схема, иллюстрирующая запись мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached» [19]. $V_{measure}$ – регистрируемый потенциал, G_{seal} – проводимость контакта, G_{input} – входная проводимость, $G_{channel}$ – проводимость одиночного канала. В модели мембранный потенциал ($V_{membrane}$) установлен на уровне -60 мВ. D, Результаты моделирования простой электрической схемы, представляющей запись мембранного потенциала в конфигурации «cell-attached» с двумя ионными каналами различной проводимости под пипеткой (24 пСм, 5 пСм)

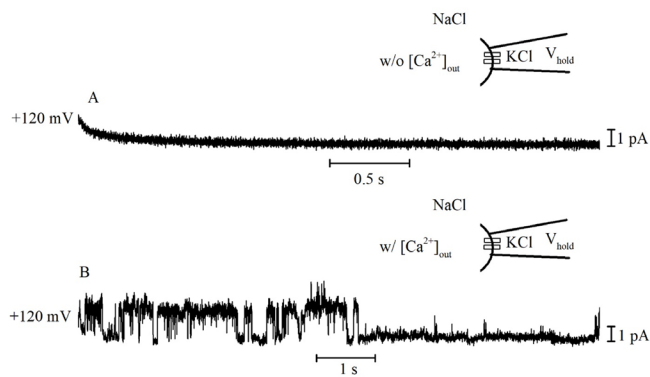


Рисунок 4. Записи токов от одиночных каналов тромбоцитов в конфигурации «inside-out». В отсутствие (A) или присутствии 10 мкМ CaCl₂ (B) во внеклеточном буферном растворе с превалирующим содержанием NaCl. Приложенный потенциал (V_{hold}) указан слева от каждой кинетики тока. Представлены типичные кинетические кривые из 12 независимых экспериментов с использованием тромбоцитов разных доноров.

максимально близким к цитозольному ионному составу клетки. Этот подход позволяет измерять мембранный потенциал тромбоцитов или любых других клеток без нарушения целостности мембраны, как и в случае конфигурации «whole cell», в которой происходит быстрая перфузия внутриклеточного содержимого пипеточным раствором.

С целью проверки данного метода нами было исследовано, как изменяется мембранный потенциал тромбоцитов, активированных миелопероксидазой (МПО), которая, как было ранее показано, оказывает модулирующее действие на агрегацию тромбоцитов, реорганизацию их цитоскелета и депо-зависимый вход кальция в данных клетках [44], а также способна активировать нейтрофилы [45] и связываться с поверхностью эритроцитов, тем самым влияя на их свойства [46, 47]. Добавление 100 нМ МПО во внеклеточный раствор приводило к небольшой гиперполяризации плазматической мембраны на уровне 10-12 мВ (рис. 3А).

В некоторых экспериментах мы наблюдали необычные спайки в записях потенциала в конфигурации «cell-attached». Данный эффект можно увидеть на рис. 3В. Эти спайки были достаточно быстрыми и имели амплитуду порядка 7-10 мВ, и были вызваны, по всей видимости, изменением самого мембранного потенциала, либо же ионным током через одиночные ионные каналы.

Мы исследовали данный эффект с использованием простой модели. Известно, что входное сопротивление мембраны тромбоцитов составляет порядка 50 ГОм [10]. Используя предложенную упрощенную модель [19] измерения мембранного потенциала в конфигурации

«cell-attached» и модифицируя её, добавив проводимость ионных каналов ($G_{channel}$), мы имитировали наличие одиночных ионных каналов под пипеткой. Итоговая электрическая схема представлена на рис. 3С.

Измененные уравнения выглядят следующим образом:

$$V_{measure} = V_{membrane} * \frac{\frac{G_{input} + G_{channel} * F(t)}{G_{seal}}}{1 + \frac{G_{input} + G_{channel} * F(t)}{G_{seal}}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$F(t) = a * e^{-\frac{(x-b)^2}{2*c^2}} \quad \text{Eq. 2}$$

Параметры модели: G_{input} - 17 пСм (59 ГОм), $G_{channel}$ - 5 пСм или 24 пСм (что соответствует полученным в данной работе проводимостям одиночных каналов), G_{seal} - переменный параметр (соответствует сопротивлению контакта ($R_{contact}$) в 20, 30 или 50 ГОм). $V_{membrane} = -60$ мВ. $F(t)$ - функция времени, которая определяет процесс открытия каналов. В нашем случае это простая функция Гаусса (ур. 2) со следующими параметрами: $a = 1$, $b = 3$, $c = 0.07$.

Результаты моделирования (рис. 3D) свидетельствуют о том, что открытие ионных каналов приводило к спайкам в записи потенциала. Амплитуда спайков обратно-пропорциональна сопротивлению контакта и прямо пропорциональна проводимости открывающихся каналов. В случае теоретически идеального гигаомного контакта (сопротивление контакта стремится к бесконечности) мы бы не смогли увидеть никаких спайков в записи потенциала во время открытия одиночных каналов. Аналогично в случае очень низкого входного сопротивления (например, при добавлении нистатина в пипетку) никаких спайков бы не было.

Ранее осциллирующий характер записей мембранного потенциала тромбоцитов при активации АДФ в конфигурации «cell-attached» были показаны Mason J. et. al [19]. Результаты настоящей работы показывают, что причиной такого поведения потенциала могут быть события открытия одиночных каналов под пипеткой. Это необходимо иметь в виду, так как показано, что мембранный потенциал мегакариоцитов может осциллировать [20].

Inside-out mode

Конфигурация «inside-out» является полезным инструментом для изучения поведения одиночных каналов при прямом действии вторичных мессенджеров различных внутриклеточных сигнальных путей, так как позволяет полностью контролировать ионный состав с обеих сторон

куска мембраны.

Для получения данной конфигурации, мы использовали ранее предложенный подход [48]. Капля вязкой жидкости (в данной работе использовали иммерсионное масло для микроскопии) помещается на дно чашки Петри, после чего проводится процедура получения гигаомного контакта. Далее пипетка с клеткой на её конце подводится к краю капли масла, и очень аккуратно погружается в него. После первого контакта клетки с маслом, пипетку отводят в сторону, что отделяет клетку, которая остается в масле, от куска мембраны на пипетке. Следуя ранее указанным рекомендациям нам удавалось получать конфигурацию «inside-out» в более чем 90% случаев, и она была стабильна в течение более чем 10 минут. Анимация процесса получения конфигурации «inside-out» представлена в Дополнительных материалах на рис. S3.

В данной конфигурации мы получили записи ионных токов через одиночные каналы в отсутствие и присутствии Ca^{2+} (рис. 4), одного из основных вторичных мессенджеров, на активность одиночных каналов тромбоцитов.

Заключение

В данный момент методика пэтч-клэмп является самым мощным инструментом для изучения ионных каналов и их роли в процессах жизнедеятельности клеток. В течение последних десятилетий стало очевидным, что ионные каналы, наравне со множеством мембранных рецепторов и внутриклеточных мессенджеров, играют огромную роль в механизмах активации тромбоцитов и их физиологическом ответе. Данная работа предлагает подходы и методы, которые могут помочь другим исследователям расширить применение метода пэтч-клэмп для изучения клеток небольших размеров и раскрыть новые механизмы, посредством которых ионные каналы управляют функциями тромбоцитов.

Вклад авторов

А.Ю.К. выполнял эксперименты, анализировал данные, писал и редактировал текст статьи; С.О.З и И.И.П. выполняли эксперименты, анализировали данные и редактировали текст статьи; И.В.Г. анализировала данные и редактировала текст статьи; Е.В.Ш. руководила проектом, планировала исследования, анализировала данные и редактировала текст статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что они не имеют конфликта интересов.

Благодарности

Мы благодарим Ф. Балабина за конструктивное обсуждение экспериментальных данных и редактирование текста статьи. Авторы благодарны Алексею Соколову (Институт Экспериментальной Медицины, Санкт-Петербург, Россия) за великодушно предоставленные МПО и тромбин.

Работа частично поддержана Белорусским Республиканским Фондом Фундаментальных Исследований (грант B20R-215).

Список литературы

1. Waggoner, A. S. (1979). Dye indicators of membrane potential. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 8(1), 47-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.08.060179.000403>.
2. Felix, J. P., Williams, B. S., Priest, B. T., Brochu, R. M., Dick, I. E., Warren, V. A., ... & Garcia, M. L. (2004). Functional assay of voltage-gated sodium channels using membrane potential-sensitive dyes. *Assay and drug development technologies*, 2(3), 260-268. <https://doi.org/10.1089/1540658041410696>.
3. Huber, C., Klimant, I., Krause, C., Werner, T., & Wolfbeis, O. S. (2001). Nitrate-selective optical sensor applying a lipophilic fluorescent potential-sensitive dye. *Analytica chimica acta*, 449(1-2), 81-93. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01363-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01363-0).
4. Burnham, C., Braw, R., & Karlsh, S. J. D. (1986). A Ca-dependent K channel in "luminal" membranes from the renal outer medulla. *The Journal of membrane biology*, 93(2), 177-186. <https://doi.org/10.1007/BF01870809>.
5. Garty, H., Rudy, B., & Karlsh, S. J. (1983). A simple and sensitive procedure for measuring isotope fluxes through ion-specific channels in heterogenous populations of membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 258(21), 13094-13099. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44085-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44085-3).
6. Garty, H. (1984). Amiloride blockable sodium fluxes in toad bladder membrane vesicles. *The Journal of membrane biology*, 82(3), 269-279. <https://doi.org/10.1007/BF01871636>.
7. Burnham, C., Karlsh, S. J. D., & Jørgensen, P. L. (1985). Identification and reconstitution of a Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter and K⁺ channel from luminal membranes of renal red outer medulla. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 821(3), 461-469. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90051-3).
8. Neher, E., Sakmann, B., & Steinbach, J. H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv*, 375(2), 219-228. <https://doi.org/10.1007/BF00584247>.
9. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>.
10. Maruyama, Y. (1987). A patch-clamp study of mammalian platelets and their voltage-gated potassium current. *The Journal of physiology*, 391(1), 467-485. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016750>.
11. Mahaut-Smith, M. P., Rink, T. J., Collins, S. C., & Sage, S. O. (1990). Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets. *The Journal of physiology*, 428(1), 723-735. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018237>.
12. Mahaut-Smith, M. P. (1995). Calcium-activated potassium channels in human platelets. *The Journal of physiology*, 484(1), 15-24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020644>.
13. Mahaut-Smith, M. P., Sage, S. O., & Rink, T. J. (1992). Rapid ADP-evoked currents in human platelets recorded with the nystatin permeabilized patch technique. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3060-3065. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50694-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50694-9).
14. Mahaut-Smith, M. P., Sage, S. O., & Rink, T. J. (1990). Receptor-activated single channels in intact human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10479-10483. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86972-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86972-1).
15. Somasundaram, B., & Mahaut-Smith, M. P. (1994). Three cation influx currents activated by purinergic receptor stimulation in rat megakaryocytes. *The Journal of physiology*, 480(2), 225-231. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020644>.

- doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020355.Somasundaram, B., Norman, J. C., & Mahaut-Smith, M. P. (1995). Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochemical Journal*, 309(3), 725-729. <https://doi.org/10.1042/bj3090725>.
16. Tolhurst, G., Carter, R. N., Amisten, S., Holdich, J. P., Erlinge, D., & Mahaut-Smith, M. P. (2008). Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets*, 19(4), 308-313. <https://doi.org/10.1080/09537100801935710>.
17. Home, W. C., & Simons, E. R. (1978). Probes of transmembrane potentials in platelets: changes in cyanine dye fluorescence in response to aggregation stimuli. *Blood*, 51(4), 741-749. <https://doi.org/10.1182/blood.V51.4.741.741>.
18. Mason, M. J., Simpson, A. K., Mahaut-Smith, M. P., & Robinson, H. P. C. (2005). The interpretation of current-clamp recordings in the cell-attached patch-clamp configuration. *Biophysical Journal*, 88(1), 739-750. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049866>.
19. Mason, M. J., Hussain, J. F., & Mahaut-Smith, M. P. (2000). A novel role for membrane potential in the modulation of intracellular Ca²⁺ oscillations in rat megakaryocytes. *The Journal of Physiology*, 524(Pt 2), 437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00437.x>.
20. Rinne, A., Mobarec, J. C., Mahaut-Smith, M., Kolb, P., & Bünemann, M. (2015). The mode of agonist binding to a G protein-coupled receptor switches the effect that voltage changes have on signaling. *Science Signaling*, 8(401), ra110-ra110. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aac7419>
21. Martinez-Pinna, J., Gurung, I. S., Vial, C., Leon, C., Gachet, C., Evans, R. J., & Mahaut-Smith, M. P. (2005). Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other G-q-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1490-1498. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407783200>.
22. Wright, J. R., Amisten, S., Goodall, A. H., & Mahaut-Smith, M. P. (2016). Transcriptomic analysis of the ion channelome of human platelets and megakaryocytic cell lines. *Thrombosis and haemostasis*, 116(2), 272. <https://doi.org/10.1160/th15-11-0891>.
23. Balduini, A., Fava, C., Di Buduo, C. A., Abbonante, V., Meneguzzi, A., Soprano, P. M., ... & Minuz, P. (2021). Expression and functional characterization of the large-conductance calcium and voltage-activated potassium channel Kca 1.1 in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1111/jth.15269>.
24. Mahaut-Smith, M. P. (2004). Patch-clamp recordings of electrophysiological events in the platelet and megakaryocyte. In *Platelets and Megakaryocytes* (pp. 277-299). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-783-1:277>.
25. Tolhurst, G., Vial, C., Léon, C., Gachet, C., Evans, R. J., & Mahaut-Smith, M. P. (2005). Interplay between P2Y1, P2Y12, and P2X1 receptors in the activation of megakaryocyte cation influx currents by ADP: evidence that the primary megakaryocyte represents a fully functional model of platelet P2 receptor signaling. *Blood*, 106(5), 1644-1651. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0725>.
26. Carter, R. N., Tolhurst, G., Walmsley, G., Vizuete-Forster, M., Miller, N., & Mahaut-Smith, M. P. (2006). Molecular and electrophysiological characterization of transient receptor potential ion channels in the primary murine megakaryocyte. *The Journal of physiology*, 576(1), 151-162. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.113886>.
27. Ogden, D., & Stanfield, P. (1994). Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. In *Microelectrode techniques: the Plymouth workshop handbook* (pp. 53-78). Company of Biologists Cambridge.
28. Priel, A., Gil, Z., Moy, V. T., Magleby, K. L., & Silberberg, S. D. (2007). Ionic requirements for membrane-glass adhesion and giga seal formation in patch-clamp recording. *Biophysical Journal*, 92(11), 3893-3900. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099119>.
29. Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Reisch, B., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2011). Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18168-18172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108094108>.
30. Taylor, K. A., & Mahaut-Smith, M. P. (2019). A major interspecies difference in the ionic selectivity of megakaryocyte Ca²⁺-activated channels sensitive to the TMEM16F inhibitor CaCCinh-A01. *Platelets*, 30(8), 962-966. <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1595560>.
31. Berna-Erro, A., Galan, C., Dionisio, N., Gomez, L. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2012). Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(8), 1242-1251. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.023>.
32. Harper, M. T., & Poole, A. W. (2013). Chloride channels are necessary for full platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant activity. *Cell death & disease*, 4(12), e969-e969. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.495>.
33. Lang, F., Munzer, P., Gawaz, M., & Borst, O. (2013). Regulation of STIM1/Orai1-dependent Ca²⁺ signalling in platelets. *Thromb Haemost*, 110(5), 925-930. <https://doi.org/10.1160/th13-02-0176>.
34. Harper, M. T., Londono, J. E. C., Quick, K., Londono, J. C., Flockerzi, V., Philipp, S. E., ... & Poole, A. W. (2013). Transient receptor potential channels function as a coincidence signal detector mediating phosphatidylserine exposure. *Science Signaling*, 6(281), ra50-ra50. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003701>.
35. Wolfs, J. L., Wielders, S. J., Comfurius, P., Lindhout, T., Giddings, J. C., Zwaal, R. F., & Bevers, E. M. (2006). Reversible inhibition of the platelet procoagulant response through manipulation of the Gardos channel. *Blood*, 108(7), 2223-2228. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-009613>.
36. McCloskey, C., Jones, S., Amisten, S., Snowden, R. T., Kaczmarek, L. K., Erlinge, D., ... & Mahaut-Smith, M. P. (2010). Kv1. 3 is the exclusive voltage-gated K⁺ channel of platelets and megakaryocytes: roles in membrane potential, Ca²⁺ signalling and platelet count. *The Journal of physiology*, 588(9), 1399-1406. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188136>.
37. Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Josefsson, E. C., White, M. J., Yao, Y., Mason, K. D., ... & Jackson, S. P. (2009). Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 114(3), 663-666. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-200345>.
38. Hess, M. W., & Siljander, P. (2001). Procoagulant platelet balloons: evidence from cryopreparation and electron microscopy. *Histochemistry and cell biology*, 115(5), 439-443. <https://doi.org/10.1007/s004180100272>.
39. Podoplelova, N. A., Sveshnikova, A. N., Kotova, Y. N., Eckly, A., Receveur, N., Nechipurenko, D. Y., ... & Panteleev, M. A. (2016). Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 128(13), 1745-1755. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-696898>.
40. Abaeva, A. A., Canault, M., Kotova, Y. N., Obydenny, S. I., Yakimenko, A. O., Podoplelova, N. A., ... & Panteleev, M. A. (2013). Procoagulant platelets form an α-granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 288(41), 29621-29632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474163>.
41. MacKenzie, A. B., Mahaut-Smith, M. P., & Sage, S. O. (1996). Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 271(6), 2879-2881. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.2879>.
42. Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K., & Nagata, S. (2015). TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12800-12805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516594112>.
43. Gorudko, I. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Grudinina, N. A., Drozd, E. S., Shishlo, L. M., ... & Panasenko, O. M. (2013). Myeloperoxidase modulates human platelet aggregation via actin cytoskeleton reorganization and store-operated calcium entry. *Biology open*, 2(9), 916-923. <https://doi.org/10.1242/bio.20135314>.
44. Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Kostevich, V. A., Kudryavtsev, I. V., ... & Panasenko, O. M. (2018). Neutrophil activation in response to monomeric myeloperoxidase. *Biochemistry and Cell Biology*, 96(5), 592-601. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0290>.
45. Shamova, E. V., Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Sokolov, A. V., Kokhan, A. U., Melnikova, G. B., ... & Panasenko, O. M. (2020). The effect of myeloperoxidase isoforms on biophysical properties of red blood cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 464(1), 119-130. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03654-0>.
46. Gorudko, I. V., Sokolov, A. V., Shamova, E. V., Grigorieva, D. V., Mironova, E. V., Kudryavtsev, I. V., ... & Timoshenko, A. V. (2016). Binding of human myeloperoxidase to red blood cells: Molecular targets and biophysical consequences at the plasma membrane level. *Archives of biochemistry and biophysics*, 591, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.12.007>.
47. MacKenzie, A. B., & Mahaut-Smith, M. P. (1996). Chloride channels in excised membrane patches from human platelets: effect of intracellular calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1278(1), 131-136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00207-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00207-3).

Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы

А.Н. Свешников^{1,2,3}, М.Г. Степанян^{1,2} и М.А. Пантелеев^{1,2,3#}

1. Физический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
3. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия

Автор для переписки: editor@sbpreports.com

Получено: 22.03.2021

Принято к публикации: 29.03.2021

Опубликовано: 31.03.2021

DOI: 10.52455/sbpr.01.202101014

Аннотация

Тромбоциты крови – небольшие безъядерные клетки, основная задача которых – формирование «пробки» для предотвращения кровотечения при нарушении целостности кровеносных сосудов. Выполнение данной роли подразумевает набор функциональных ответов, индуцируемых различными агонистами и координируемых внутренней сетью передачи молекулярного сигнала. Понимание устройства данной сети является ключевой задачей как для фундаментальных исследований, так и для идентификации новых терапевтических мишеней при нарушениях системы гемостаза. Данная серия обзоров будет посвящена регуляции внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах, исследованию молекулярной связи между активацией рецепторов и функциональными ответами тромбоцитов, а также о влиянии сигнальных путей друг на друга. Настоящая статья, первая из двух, сосредоточена на описании функциональных ответов тромбоцитов и условий, при которых они происходят.

Ключевые слова: гемостаз, тромбоз, формирование тромба, активация тромбоцитов, внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах

Введение

Гемостаз – строго регулируемая по пространству и времени система организма человека [1], необходимая для предотвращения кровопотерь при повреждении кровеносных сосудов. Ключевую роль в этой системе играют тромбоциты [2]. Помимо выполнения своих непосредственных физиологических функций – формирования клеточного агрегата в области повреждения кровеносных сосудов, тромбоциты важны и для других физиологических

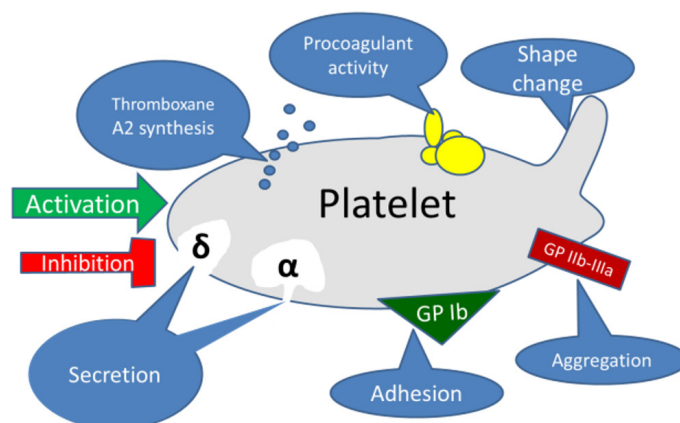


Схема 1. Схема основных функциональных ответов тромбоцитов на активацию (каждый из них может быть остановлен ингибиторным сигналом). Голубые овалы означают функции; жёлтые овалы означают факторы свёртывания крови, которые могут образовывать комплексы на поверхности прокоагулянтных тромбоцитов; GPIIb-IIIa (αIIbβ3) – основной (но не единственный) тромбоцитарный интегрин, являющийся ключевым для агрегации тромбоцитов; GPIb представляет собой рецепторный комплекс, необходимый для связывания с фактором фон Виллебранда – белком, инициирующим начальную адгезию тромбоцитов к области повреждения.

процессов: ускорение мембранно-зависимых реакций свёртывания крови [3,4], поддержание целостности сосудистых стенок [5-7], регуляция иммунных ответов [8-10], рост и регенерация тканей [11, 12]. Для корректного выполнения каждой из этих функций в нужном месте и в нужное время, в тромбоцитах существует обширная система мембранных рецепторов и путей передачи внутриклеточных сигналов.

Активация тромбоцитов приводит к целому набору различных функциональных ответов [13] (Рис. 1). Исходя из этого, немалым является и количество положительных и отрицательных стимулов, которые должны обрабатываться внутриклеточными сигнальными сетями, чтобы тромбоцитом было принято адекватное

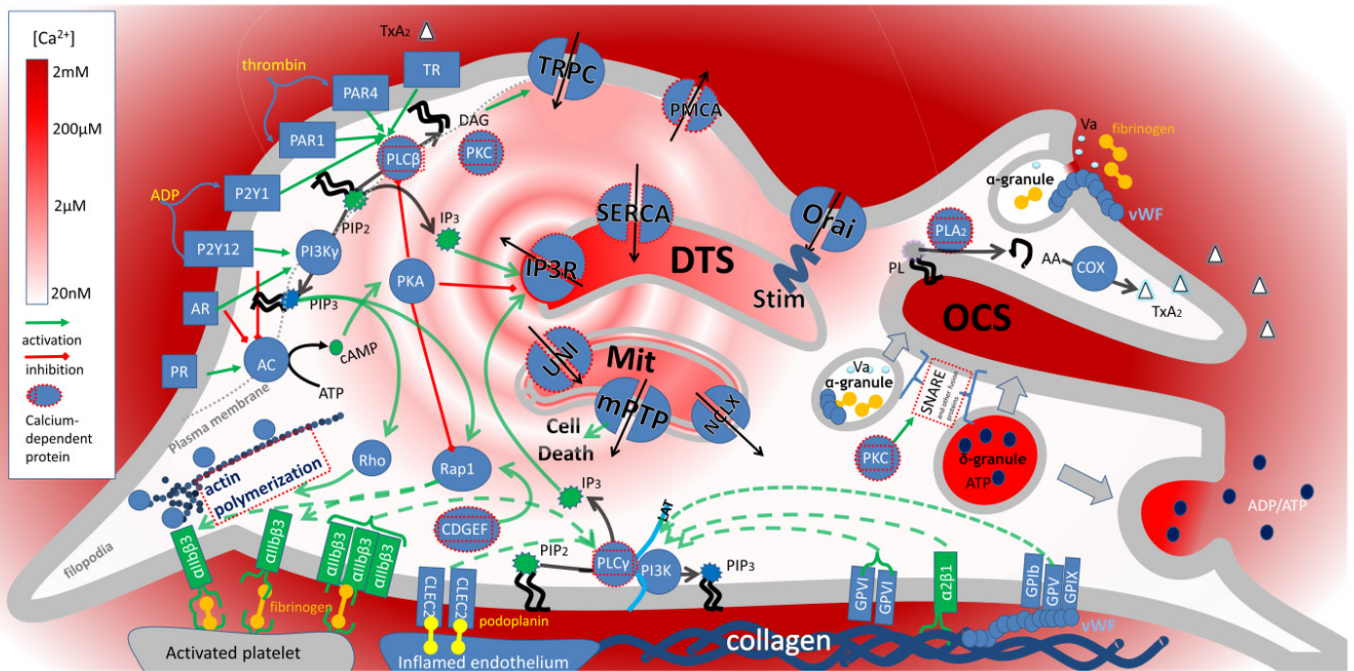


Схема 2. Схема взаимодействия между активационными сигналами (тромбин, АДФ, коллаген, тромбоксан A₂, vWF, подоплаинин и адреналин) и функциональными ответами тромбоцитов (изменение формы, выражающееся формированием филоподий; адгезия и агрегация, изображённая активацией интегринов; секреция гранул и синтез тромбоксана A₂). Все типы активации тромбоцитов приводят к активации фосфолипазы C (PLC) и, в большинстве случаев, фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Эти ферменты запускают наработку двух наиболее важных вторичных мессенджеров для активации тромбоцитов – кальция (выраженного оттенками красного) и фосфоинозитид-3,4,5-трифосфата (PIP₃). Все функциональные ответы тромбоцитов управляются либо одним, либо сразу обоими из данных мессенджеров. Некоторые из известных кальций-чувствительных белков отображены красными точками. Прямая активация показана зелёными линиями. Ингибирование – красными линиями. Непрямые взаимодействия показаны пунктирными линиями. Аббревиатуры: AC – аденилат-циклаза, AR – α_{2A} адренорецептор, CDGEF – кальций-диацилглицерол гуанодинотвичный обменник I (CaDAGGEFI), COX – циклооксигеназа, DAG – диацилглицерол, DTS – плотная трубчатая система (ЭПР тромбоцитов), IP₃R – инозитол-1,4,5-трифосфат рецептор, Mit – митохондрии, mPTP – митохондриальная пора, NCLX – митохондриальный натрий/кальциевый обменник, OCS – открытая канальцевая система, P₂Y – пуриновый рецептор тромбоцитов, PAR – протеаза активируемый рецептор, PIP₂ – фосфоинозитол-4,5-бисфосфат, PIP₃ – фосфоинозитол-3,4,5-трисфосфат, PKA – протеин киназа A, PKC – протеин киназа C, PL – фосфолипид, PLA₂ – фосфолипаза A₂, PMCA – мембранная кальциевая АТФаза, PR – рецептор к PGI₂, SERCA – саркоплазматическая/эндоплазматическая ретикулярная кальциевая АТФаза, TR – рецептор к тромбоксану A₂ (TxA₂), TRPC – канал, чувствительный к переменному мембранному потенциалу, UNI – митохондриальный унипортер, Va – активированный фактор свёртывания V, vWF – фактор фон Виллебранда.

конкретной ситуации решение [14]. Помимо активационных, в последние годы было показано существование и нескольких ингибиторных сигнальных путей в тромбоците [15, 16]. Таким образом, внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах, инициируемая по меньшей мере десятью основными рецепторами, состоящая из нескольких переплетённых белковых каскадов и выражающаяся различными функциональными проявлениями, может показаться весьма запутанной (Рис. 2).

Пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах обыкновенно анализируются не как полноценная сеть, а как более простые отдельные цепочки «стимул-ответ». Например: активатор X стимулирует рецептор Y, приводя к наработке вторичного мессенджера Z, который управляет дальнейшими ответами «1», «2»,

«3». Взаимодействие различных рецепторов, которые могли бы работать кооперативно или же, напротив, инактивировать друг друга, обычно не оценивается. Интересно, что в других областях, таких как иммунология, термины «ко-активатор» или «ко-рецептор» уже стали достаточно распространены [17, 18]. Распространение сигнала по коллатеральным сигнальным путям, формирование разных ответов на разные дозы одного и того же агониста, принципы кодирования и декодирования сигнала редко обсуждаются даже за пределами области тромбоцитов [19] и тем более почти никогда для тромбоцитов.

Другой обычно упускаемый тип сигнализации в тромбоцитах — это механочувствительность. Данный факт тем более удивителен, что вся жизнь тромбоцитов проходит в потоках крови разных скоростей. Имеется достаточно

сведений в пользу того, что тромбоциты могут «ощущать» как скорость сдвига кровотока, так и его турбулентность [20–23]. Этот вопрос будет обсуждаться в следующей части данной серии обзоров. В этой части мы сосредоточимся на функциональных ответах тромбоцитов, а не на инициирующих их сигналах, выделим основные принципы обработки сигналов тромбоцитов и принятия ими решений. Не вдаваясь в подробности внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах, мы стремимся прежде всего показать функциональные проявления этой сигнализации и ситуации, в которых эти проявления важны.

Функциональные ответы и их непосредственные причины

О функциональных ответах тромбоцитов мы будем говорить прежде всего в контексте гемостаза, так как данные виды ответов наиболее подробно изучены. Минимальный набор тромбоцитарных функций, необходимых для реакции на повреждение, обычно включает в себя активацию интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [24], секрецию плотных гранул [25], секрецию альфа-гранул [26], синтез тромбоксана A₂, изменение формы, контракцию и прокоагулянтную активность [28] (Рис. 1). Первичная адгезия тромбоцитов, управляемая гликопротеином Ib, не учитывается, так как она не требует активации тромбоцитов [29]. Важно отметить, что все вышеоговорённые функциональные ответы, вероятно, не одинаково важны или же, что более верно, не каждый из них был чётко продемонстрирован при гемостазе.

Активация интегринов

Активация интегринов считается наиболее важным функциональным ответом тромбоцитов. В случае отсутствия интегринов на поверхности тромбоцитов человека, как, например, при тромбастении Гланцмана, могут наблюдаться тяжёлые кровотечения [30]. На поверхности тромбоцитов присутствует приблизительно 100000 молекул интегринов $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, которые могут значительно изменять свою аффинность к фактору фон Виллебранда и фибриногену в процессе активации, напрямую влияя на формирование тромбоцитарных агрегатов [24]. Считается, что все активаторы тромбоцитов, включая и биомеханическую активацию тромбоцитов фактором фон Виллебранда через рецептор GPIb, в какой-то степени приводят к активации интегринов [31]. Данный функциональный ответ тромбоцитов градуален и, вероятно, содержит промежуточные фазы активации [21]. Непосредственной причиной перехода интегрин между состояниями является образование большого комплекса

белков, ассоциированного с цитоскелетом, на цитозольной стороне плазматической мембраны. Решающую структурную роль в этом комплексе играют белки талин-1 [32] и киндлин-3 [33], а переключателем передачи сигнала, запускающим формирование данного комплекса, считается малая растворимая цитозольная ГТФаза Rap1-GTP [31,32, 34]. Помимо $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ тромбоциты имеют ряд других интегринов, специфичных к коллагену, фибронектину, ламинину и другим молекулам. Их значимость для гемостаза ясна в меньшей степени, в то время как механизмы активации кажутся похожими [31,35,36].

Секреция плотных гранул

Плотные (или дельта, δ -) гранулы представляют собой специфичные для тромбоцитов органеллы, содержимое которых высвобождается при активационном сигнале [25,37,38]. Плотные гранулы содержат, в основном, низкомолекулярные соединения, главным из которых является АДФ, способный активировать соседние тромбоциты [39]. Другим компонентом, который в последнее время привлекает большое внимание, является полифосфат, имеющий ряд потенциальных ролей в каскаде свертывания крови [40,41]. Функциональная роль других компонентов плотных гранул, таких как АТФ, серотонин и кальций, ясна в меньшей степени [41,42]. В отличие от активации интегринов, высвобождение плотных гранул происходит только при сильной стимуляции. Так, при стимуляции тромбоцитов АДФ (считающимся слабым активатором), секреция плотных гранул происходит достаточно слабо [43]. Внутриклеточный механизм дифференциального высвобождения плотных гранул до сих пор остается спорным [37,38] и будет обсуждаться в следующей части этого обзора. Ключевым регулятором передачи сигнала, опосредующим эти процессы, предположительно, являются различные изоформы протеинкиназы C [44,45] и мембранные фосфатидилинозитолы [46,47].

Секреция альфа гранул

Альфа (α -) гранулы представляют собой другой тип тромбоцитарных внутриклеточных везикул, высвобождаемых при активации тромбоцитов. Интересно, что в отличие от плотных гранул, α -гранулы не являются обязательно сферическими структурами [48]. α -гранулы несут в себе в основном белки, среди которых выделяют фибриноген, фактор фон Виллебранда, фактор V, ингибитор компонента системы комплемента C1, факторы роста и другие молекулы. [26,49]. Мембраны альфа-гранул содержат дополнительные интегрин и P-селектин. Некоторые исследования

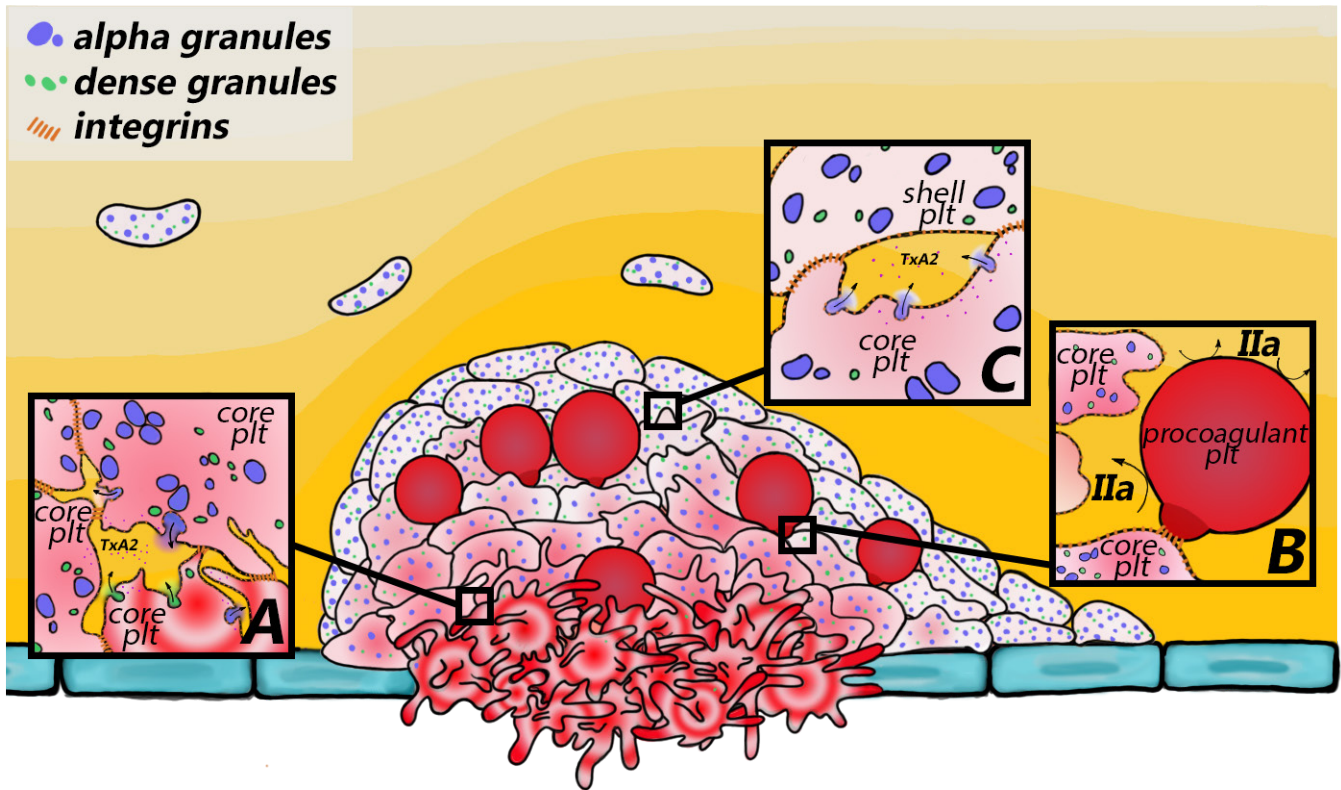


Рисунок 3. Функциональные ответы тромбоцитов при формировании артериального тромба. Тромб условно делится на две области: «ядро» и «шубу» [86]. Концентрация цитозольного кальция в тромбоцитах показана оттенками красного, кружки указывают на кальциевые осцилляции. Предполагается, что интенсивность кальциевой сигнализации отражает уровень активации тромбоцитов. Траектории клеток в кровотоке показаны с помощью градиентного желтого цвета. (А) «Ядро» тромба состоит из дегранулированных, сформировавших филоподии и ламеллоподии тромбоцитов и несколько менее активированных тромбоцитов, близко прилегающих к ним. Эти активированные тромбоциты высвобождают содержимое плотных и альфа-гранул (показано стрелками), а также синтезируют тромбоксан А2 (показан фиолетовыми точками) в просвет между клетками. Интегрины связывают фибриноген, образуя «мосты» между соседними тромбоцитами (оранжевые линии). (В) Прокоагулянтные тромбоциты обеспечивают поверхность для мембранозависимых реакций свертывания плазмы, в конечном итоге катализирующих образование тромбина (IIa). Со временем тромбоциты «ядра» выдавливают их в сторону оболочки («шубы»). (С) Тромбоциты оболочки имеют форму диска и содержат большое количество гранул обоих типов. Они последними оседают на тромбе и связаны с ним мостами интегрин-фибриноген-интегрин. Сокращения: plt - тромбоцит, TxA2 - тромбоксан А2, IIa – тромбин (активный фактор свёртывания II).

предполагают, что компоненты тромбоцитов, активирующие контактный путь свёртывания плазмы крови, содержатся именно в альфа-, а не в плотных гранулах [50]. Имеются данные о том, что существуют подтипы альфа-гранул с разным содержанием, высвобождаемые при разной стимуляции [51]. Белки из альфа-гранул участвуют в агрегации тромбоцитов, коагуляции, ангиогенезе, иммунитете, воспалении, поддержании/восстановлении целостности сосудистой стенки и других жизненно важных процессах [5,52,53]. Тем не менее, единственным компонентом альфа-гранул, гемостатическая функция которого хорошо установлена, является фактор V, который присутствует в них в значительных количествах и в частично активированной форме. Важность тромбоцитарного фактора V подтверждена как на животных моделях, так и для людей [54,55]. Интересно, что белки альфа-гранул остаются связанными с прокоагулянтными тромбоцитами [56], образуя зависимую от полимеризации

фибрина и активности трансглутаминазы «шапку» [57]. Функция данных структур не до конца ясна, хотя было показано, что «шапка» необходима для прикрепления прокоагулянтных тромбоцитов к агрегатам [58]. Считается, что высвобождение альфа-гранул инициируется почти всеми активаторами тромбоцитов [59–61].

Прокоагулянтная активность

Помимо «проагрегантных» тромбоцитов есть и другая субпопуляция – прокоагулянтные тромбоциты, на поверхности которых происходит ускорение мембрана-зависимых реакций свёртывания плазмы крови. Более того, исходя из последних данных, можно предположить, что прокоагулянтная активность данной субпопуляции регулируется специальной клеточной структурой в тромбоцитах [62]. Следовательно, формирование прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов – функциональный ответ, механизмы развития которого значительно отличаются от механизмов

других ответов, которые более равномерно происходят в популяции тромбоцитов. При формировании субпопуляции прокоагулянтных тромбоцитов происходит инактивация интегринов [63]. Прокоагулянтные тромбоциты образуются при сильной стимуляции тромбином или агонистами гликопротеина VI (например, коллагена) по пути некроза [64], вызванного перегрузкой митохондрий кальцием [65,66]. Интересно, что и более слабые активаторы, такие как АДФ, способны тонко регулировать образование прокоагулянтных тромбоцитов [67].

Другие ответы тромбоцитов

Самый ранний ответ тромбоцитов на любые виды активации, даже очень незначительные, — это изменение формы от эллипсоида к сфере, связанное с реорганизацией периферического кольца микротрубочек [68,69]. Функциональная значимость этого перехода не ясна. После изменения формы на сферическую происходит образование ламеллиподий и филоподий, приводящих к увеличению площади поверхности тромбоцитов и, как следствие, увеличению площади поверхности контакта с тромбоцитом друг с другом в агрегате, а также со стенкой сосудов [70]. Эти стадии вызываются перестройкой актинового цитоскелета [70,71], в значительной степени индуцируемой тромбином и поддерживаемой АДФ. В меньшей степени подобное «распластывание» тромбоцитов зависит от активации коллагеном [71]. Способность тромбоцитов изменять свою форму значительно влияет на упаковку тромбоцитов внутри тромба, что приводит к увеличению плотности тромбов и снижению их пористости [72]. Неясно, насколько изменение формы принципиально необходимо с точки зрения формирования плотного тромбоцитарного сгустка, поскольку некорректно регулируемая полимеризация актина у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича приводит к формированию уменьшенных тромбоцитов, но не к их дисфункции [66,73].

Другой ранний и легко индуцируемый ответ — синтез тромбоксана А₂, производимый фосфолипазой А₂, циклооксигеназой (в основном ЦОГ-1) и тромбоксансинтазой [74]. Тромбоксан А₂ представляет собой липидный эйкозаноид, действующий на тромбоциты подобно АДФ [75]. До сих пор не ясно, может ли тромбоксан А₂ активировать тромбоцит, произведший его. На первом этапе синтеза тромбоксана в тромбоцитах арахидоновая кислота отрезается от мембранных фосфолипидов фосфолипазой А₂, а на втором этапе происходит непосредственно образование тромбоксана А₂ в результате активности ЦОГ и тромбоксансинтазы. Интересно, что при синтезе тромбоксана единственной строго регулируемой

стадией является стадия активации фосфолипазы А₂. Поэтому продукция тромбоксана А₂ покоящимися тромбоцитами может быть индуцирована при добавлении арахидоновой кислоты к суспензии тромбоцитов, что позволяет «обойти» стадию активности фосфолипазы А₂ [76]. Тромбоциты имеют две изоформы фосфолипаз А₂: С и I. Первая активируется при небольшом повышении концентрации кальция в цитозоле, и, вероятно, поэтому все классические активаторы тромбоцитов вызывают синтез тромбоксана. Второй тип фосфолипазы А₂ активируется независимо от кальция, и его роль в тромбоцитах еще не ясна [77]. ЦОГ-1 инактивируется аспирином и является одной из основных мишеней антиагрегантной терапии, назначаемой пациентам с заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Таким образом, можно предположить важность синтеза тромбоксана А₂ для формирования артериальных тромбов [78].

Контракция тромбоцитов, иногда называемая «ретракцией», происходит на более поздней стадии образования пробки/тромба и является результатом классического взаимодействия актин/миозин [79]. Контракция наблюдается при активации тромбоцитов различными агонистами, однако сигнальные пути, запускающие контракцию, в настоящий момент малоизучены. Показано, что передача сигналов интегринными «снаружи-внутри» является ключевой для этого процесса [80]. Кроме того, кальций-зависимый фермент, киназа легкой цепи миозина II (КЛЦМ) также важна для ретракции [81]. Недавние исследования показали, что контракция может быть необходима при перестройке архитектуры тромба. Например, при вытеснении прокоагулянтных тромбоцитов на периферию тромбов для ускорения полимеризации фибрина в этих областях [27], для организации ишемических тромбов [82] или для повышения концентрации тромбоцитов на периферии фибринового сгустка, а также для механического увеличения локальной плотности фибрина [83].

Заключение

Некоторые из тромбоцитарных ответов имеют решающее значение для образования тромбоцитарной пробки (интегрины, плотные гранулы, тромбоксан А₂), в то время как другие необходимы, скорее, для усиления свёртывания плазмы крови (прокоагулянтная активность, альфа-гранулы). Другие ответы, хотя и являются важными, имеют менее четко определенную область применимости, например, контракция и изменение формы.

Эти ответы организованы в пространстве и времени: они возникают на разных стадиях в разных частях тромба (рис. 3). Разные степени активации интегринов необходимы для формирования всего тела тромба: плотно упакованных регионов с сильно активированными тромбоцитами в «ядре» тромба и более «рыхлых» регионов слабо активированных тромбоцитов на периферии тромба. Высвобождение плотных гранул принципиально важно для активации тромбоцитов на небольшом удалении от поврежденной области. Альфа-гранулы и прокоагулянтные тромбоциты необходимы для образования фибрина и затвердевания тромба.

Для всех этих ответов существует иерархия тромбоцитарных ответов по степени их силы: некоторые из ответов тромбоцитов индуцируются при всех или практически всех видах стимуляции (высвобождение α -гранул, слабая активация интегринов), в то время как другие требуют сильной активации (плотные гранулы, прокоагулянтная активность). Некоторые из ответов являются постепенными, что означает, что реакция постепенно увеличивается в широком диапазоне условий активации (плотные гранулы), в то время как другие похожи на триггерные, что означает, что они либо полностью реализованы, либо не реализованы вообще (альфа-гранулы).

Взаимодействие сигнальных путей, а также кодирование и декодирование информации, порождающие вышеописанные функциональные ответы, мы рассмотрим в следующей части обзора. В качестве заключительной ремарки стоит упомянуть, что именно использование методов современной системной биологии [14,84,85] в значительной степени облегчает наше понимание взаимосвязи рецептор-функция тромбоцитов.

Вклад авторов

А.Н.С. делала рисунки, писала текст и редактировала статью; М.Г.С. делала рисунки, писала текст и редактировала статью; М.А.П. руководил исследованием, писал текст и редактировал статью.

Конфликт интересов

Все авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Финансирование

Исследование было поддержано грантом Российского Научного Фонда (Грант 21-74-20087).

Список литературы

1. Panteleev MA, Dashkevich NM, Ataullakhanov FI.

Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015;136:699–711. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.07.025>.

2. Getz TM, Piatt R, Petrich BG, Monroe D, Mackman N, Bergmeier W. Novel mouse hemostasis model for real-time determination of bleeding time and hemostatic plug composition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2015;13:417–25. <https://doi.org/10.1111/jth.12802>.
3. Panteleev MA, Saenko EL, Ananyeva NM, Ataullakhanov FI. Kinetics of Factor X activation by the membrane-bound complex of Factor IXa and Factor VIIIa. *Biochem J* 2004;381:779–94. <https://doi.org/10.1042/BJ20031748>.
4. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kurasawa JH, Sarafanov AG, Chambost H, Vasil'Ev SA, et al. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2016;1858:1216–27.
5. Deppermann C. Platelets and vascular integrity. *Platelets* 2018;29:549–55. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1428739>.
6. Martyanov AA, Kaneva VN, Panteleev MA, Sveshnikova AN. Physiological and pathophysiological aspects of blood platelet activation through CLEC-2 receptor. *Oncohematology* 2018;13:83–90.
7. Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity: Platelets and vascular integrity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011;9:56–65. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x>.
8. Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, Mackman N, et al. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* 2013;JCI65154. <https://doi.org/10.1172/JCI65154>.
9. Schattner M, Jenne CN, Negrotto S, Ho-Tin-Noe B. Editorial: Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation. *Front Immunol* 2020;11:1079. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01079>.
10. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2020;4:23–35. <https://doi.org/10.1002/rth2.12266>.
11. Nebie O, Barro L, Wu Y-W, Knutson F, Buée L, Devos D, et al. Heat-treated human platelet pellet lysate modulates microglia activation, favors wound healing and promotes neuronal differentiation in vitro. *Platelets* 2020;0:1–12. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1732324>.
12. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker

- SC, Honn KV. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev* 2017;36:249–62. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9673-1>.
13. Panteleev MA, Sveshnikova AN. Platelets and hemostasis. *Oncohematology* 2014;9:65–73.
 14. Dunster JL, Panteleev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Mathematical Techniques for Understanding Platelet Regulation and the Development of New Pharmacological Approaches. In: Gibbins JM, Mahaut-Smith M, editors. *Platelets and Megakaryocytes : Volume 4, Advanced Protocols and Perspectives*, New York, NY: Springer; 2018, p. 255–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8585-2_15.
 15. Coxon CH, Geer MJ, Senis YA. ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood* 2017;129:3407–18. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-720185>.
 16. Geer MJ, van Geffen JP, Gopalasingam P, Vögtle T, Smith CW, Heising S, et al. Uncoupling ITIM receptor G6b-B from tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 disrupts murine platelet homeostasis. *Blood* 2018;132:1413–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-802975>.
 17. Scheibel M, Klein B, Merkle H, Schulz M, Fritsch R, Greten FR, et al. IκBβ is an essential co-activator for LPS-induced IL-1β transcription in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2010;207:2621–30. <https://doi.org/10.1084/jem.20100864>.
 18. Inman BA, Frigola X, Dong H, Kwon ED. Costimulation, Coinhibition and Cancer. *Current Cancer Drug Targets* 2007;7:15–30. <https://doi.org/10.2174/156800907780006878>.
 19. Vinayagam A, Stelzl U, Foulle R, Plassmann S, Zenkner M, Timm J, et al. A Directed Protein Interaction Network for Investigating Intracellular Signal Transduction. *Science Signaling* 2011;4:rs8–rs8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001699>.
 20. Hansen CE, Qiu Y, McCarty OJT, Lam WA. Platelet Mechanotransduction. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2018;20:253–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121215>.
 21. Chen Y, Ju LA, Zhou F, Liao J, Xue L, Su QP, et al. An integrin αIIbβ3 intermediate affinity state mediates biomechanical platelet aggregation. *Nat Mater* 2019;18:760–9. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0323-6>.
 22. Ilkan Z, Wright JR, Goodall AH, Gibbins JM, Jones CI, Mahaut-Smith MP. Evidence for shear-mediated Ca²⁺ entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line. *Journal of Biological Chemistry* 2017;292:9204–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.766196>.
 23. Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Shigemori T, Kato Y, Ohno M, et al. Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell* 2018;174:636–648.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.011>.
 24. Kaneva VN, Martyanov AA, Morozova DS, Panteleev MA, Sveshnikova AN. Platelet Integrin αIIbβ3: Mechanisms of Activation and Clustering; Involvement into the Formation of the Thrombus Heterogeneous Structure. *Biochem Moscow Suppl Ser A* 2019;13:97–110. <https://doi.org/10.1134/S1990747819010033>.
 25. King SM, McNamee RA, Hough AK, Patel R, Brands M, Reed GL. Platelet dense granule secretion plays a critical role in thrombosis and subsequent vascular remodeling in atherosclerotic mice. *Circulation* 2009;120:785–91. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.845461>.
 26. Jr JEI, Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7:173–6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03387.x>.
 27. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, et al. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2019;39:37–47.
 28. Tutwiler V, Litvinov RI, Lozhkin AP, Peshkova AD, Lebedeva T, Ataulakhanov FI, et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood* 2016;127:149–59. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-647560>.
 29. Dong JF, Berndt MC, Schade A, McIntire LV, Andrews RK, López JA. Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. *Blood* 2001;97:162–8. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.1.162>.
 30. Nurden P, Stritt S, Favier R, Nurden AT. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica* 2021;106:337–50. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.248153>.
 31. Stefanini L, Bergmeier W. RAP GTPases and platelet integrin signaling. *Platelets* 2019;30:41–7. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1476681>.
 32. Lagarrigue F, Paul DS, Gingras AR, Valadez AJ, Sun H, Lin J, et al. Talin-1 is the principal platelet Rap1 effector of integrin activation. *Blood* 2020;136:1180–90. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005348>.
 33. Gao J, Huang M, Lai J, Mao K, Sun P, Cao Z, et al. Kindlin supports platelet integrin αIIbβ3 activation by interacting with paxillin. *J Cell Sci* 2017;130:3764–75. <https://doi.org/10.1242/jcs.205641>.
 34. Stefanini L, Boulaftali Y, Ouellette TD, Holinstat M, Désiré L, Leblond B, et al. Rap1-Rac1 circuits

- potentiate platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:434–41. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.239194>.
35. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, De Arcangelis A, et al. Platelet integrin $\alpha\beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* 2016;1:e88245. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88245>.
36. Lakshmanan HHS, Melrose AR, Sepp A-LI, Mitrugno A, Ngo ATP, Khader A, et al. The basement membrane protein nidogen-1 supports platelet adhesion and activation. *Platelets* 2020;1–5. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1745170>.
37. Cardenas EI, Breaux K, Da Q, Flores JR, Ramos MA, Tuvim MJ, et al. Platelet Munc13-4 regulates hemostasis, thrombosis and airway inflammation. *Haematologica* 2018;103:1235–44. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.185637>.
38. Williams CM, Li Y, Brown E, Poole AW. Platelet-specific deletion of SNAP23 ablates granule secretion, substantially inhibiting arterial and venous thrombosis in mice. *Blood Adv* 2018;2:3627–36. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023291>.
39. Zheng TJ, Lofurno ER, Melrose AR, Lakshmanan HHS, Pang J, Phillips KG, et al. Assessment of the effects of Syk and BTK inhibitors on GPVI-mediated platelet signaling and function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2021. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00296.2020>.
40. Labberton L, Long AT, Gendler SJ, Snozek CL, Stavrou EX, Nickel KF, et al. A Flow Cytometry-Based Assay for Procoagulant Platelet Polyphosphate. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:369–73. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21492>.
41. Suess PM, Smith SA, Morrissey JH. Platelet polyphosphate induces fibroblast chemotaxis and myofibroblast differentiation. *J Thromb Haemost* 2020;18:3043–52. <https://doi.org/10.1111/jth.15066>.
42. Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules. *Biosci Rep* 2018;38. <https://doi.org/10.1042/BSR20180458>.
43. Leunissen TC, Wisman PP, van Holten TC, de Groot PG, Korporaal SJ, Koekman AC, et al. The effect of P2Y₁₂ inhibition on platelet activation assessed with aggregation- and flow cytometry-based assays. *Platelets* 2017;28:567–75. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1246713>.
44. Harper MT, Poole AW. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2010;8:454–62. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03722.x>.
45. Murugappan S, Tuluc F, Dorsam RT, Shankar H, Kunapuli SP. Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *J Biol Chem* 2004;279:2360–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306960200>.
46. Li X, Garrity AG, Xu H. Regulation of membrane trafficking by signalling on endosomal and lysosomal membranes. *J Physiol* 2013;591:4389–401. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.258301>.
47. Ma C-IJ, Yang Y, Kim T, Chen CH, Polevoy G, Vissa M, et al. An early endosome-derived retrograde trafficking pathway promotes secretory granule maturation. *J Cell Biol* 2020;219. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808017>.
48. Pokrovskaya I, Tobin M, Desai R, Aronova MA, Kamykowski JA, Zhang G, et al. Structural analysis of resting mouse platelets by 3D-EM Reveals an unexpected variation in α -granule shape. *Platelets* 2020;1–10. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1799970>.
49. Parsons MEM, Szklanna PB, Guerrero JA, Wynne K, Dervin F, O'Connell K, et al. Platelet Release Proteome Profiling Reveals a Core Set of Proteins with Low Variance between Healthy Adults. *Proteomics* 2018;18:e1800219. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800219>.
50. Zakharova NV, Artemenko EO, Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Demina IA, Ataulakhanov FI, et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One* 2015;10:e0116665.
51. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood* 2011;117:3907–11. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327007>.
52. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12:261–73. <https://doi.org/10.1080/09537100120068170>.
53. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Res* 2018;7:236. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13283.1>.
54. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews* 2015;29:153–62. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>.
55. Bouchard BA, Chapin J, Brummel-Ziedins KE, Durda P, Key NS, Tracy PB. Platelets and platelet-derived factor Va confer hemostatic competence in complete factor V deficiency. *Blood* 2015;125:3647–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-589580>.
56. Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 2005;3:2185–92. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01185.x>.

org/10.1111/j.1538-7836.2005.01274.x.

57. Abaeva AA, Canault M, Kotova YN, Obydennyi SI, Yakimenko AO, Podoplelova NA, et al. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered "cap" on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem* 2013;288:29621–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474163>.
58. Yakimenko AO, Verholomova FY, Kotova YN, Ataullakhanov FI, Pantelev MA. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J* 2012;102:2261–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.004>.
59. Allman-Farinelli MA, Bendall L, Troy J, Versluis C, Hall D, Favaloro EJ, et al. A simple, whole blood method for assessment of platelet function: application to dietary intervention. *Thromb Res* 1998;90:163–9. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(98\)00030-9](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(98)00030-9).
60. Graff J, Klinkhardt U, Schini-Kerth VB, Harder S, Franz N, Bassus S, et al. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:952–7. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.952>.
61. Quinton TM, Murugappan S, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Different G protein-coupled signaling pathways are involved in alpha granule release from human platelets. *J Thromb Haemost* 2004;2:978–84. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00741.x>.
62. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, Eckly A, Receveur N, Nechipurenko DYU, et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood* 2016;128:1745–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-696898>.
63. Mattheij NJA, Gilio K, van Kruchten R, Jobe SM, Wieschhaus AJ, Chishti AH, et al. Dual Mechanism of Integrin α IIb β 3 Closure in Procoagulant Platelets*. *Journal of Biological Chemistry* 2013;288:13325–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428359>.
64. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116:2011–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261669>.
65. Sveshnikova AN, Ataullakhanov FI, Pantelev MA. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol BioSyst* 2015;11:1052–60. <https://doi.org/10.1039/C4MB00667D>.
66. Obydennyi SI, Artemenko EO, Sveshnikova AN, Ignatova AA, Varlamova TV, Gambaryan S, et al. Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott-Aldrich syndrome platelets. *Haematologica* 2020;105:1095–106.
67. Shakhidzhanov SS, Shaturny VI, Pantelev MA, Sveshnikova AN. Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2015;1850:2518–29.
68. Diagouraga B, Grichine A, Fertin A, Wang J, Khochbin S, Sadoul K. Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation. *J Cell Biol* 2014;204:177–85. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306085>.
69. Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20143484>.
70. Poulter NS, Pollitt AY, Davies A, Malinova D, Nash GB, Hannon MJ, et al. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott-Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nat Commun* 2015;6:7254. <https://doi.org/10.1038/ncomms8254>.
71. Bender M, Palankar R. Platelet Shape Changes during Thrombus Formation: Role of Actin-Based Protrusions. *Hamostaseologie* 2021;41:14–21. <https://doi.org/10.1055/a-1325-0993>.
72. Mirramezani M, Herbig BA, Stalker TJ, Netter L, Cooper M, Weisel JW, et al. Platelet packing density is an independent regulator of the hemostatic response to injury. *J Thromb Haemost* 2018;16:973–83. <https://doi.org/10.1111/jth.13986>.
73. Shcherbina A, Cooley J, Lutskiy MI, Benarafa C, Gilbert GE, Remold-O'Donnell E. WASP plays a novel role in regulating platelet responses dependent on α IIb β 3 integrin outside-in signalling. *British Journal of Haematology* 2010;148:416–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07959.x>.
74. Russo I, Penna C, Musso T, Popara J, Alloati G, Cavalot F, et al. Platelets, diabetes and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Diabetol* 2017;16. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0550-6>.
75. Barinov EF. [Thromboxane A2: Mechanisms of Synthesis and Intracellular Signaling System of Realization]. *Kardiologiya* 2016;56:83–90. <https://doi.org/10.18565/cardio.2016.4.83-90>.
76. Olechowski B, Ashby A, Mariathas M, Khanna V, Mahmoudi M, Curzen N. Is arachidonic acid stimulation really a test for the response to aspirin? Time to think again? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2017;15:35–46. <https://doi.org/10.1080/14779072.2017.1266255>.
77. Yoda E, Rai K, Ogawa M, Takakura Y, Kuwata H, Suzuki H, et al. Group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 γ) regulates platelet activation, hemostasis and thrombosis in mice. *PLoS One* 2014;9:e109409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109409>.
78. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis. *Interv*

Cardiol Clin 2017;6:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.iccl.2016.08.001>.

79. Johnson GJ, Leis LA, Krumwiede MD, White JG. The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction. *J Thromb Haemost* 2007;5:1516–29. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02611.x>.
80. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Cooray P, Salem HH, Jackson SP. Calpain Cleavage of Focal Adhesion Proteins Regulates the Cytoskeletal Attachment of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Platelet Glycoprotein IIb/IIIa) and the Cellular Retraction of Fibrin Clots *. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:1694–702. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1694>.
81. Egot M, Kauskot A, Lasne D, Gaussem P, Bachelot-Loza C. Biphasic myosin II light chain activation during clot retraction. *Thromb Haemost* 2013;110:1215–22. <https://doi.org/10.1160/TH13-04-0335>.
82. Khismatullin RR, Nagaswami C, Shakirova AZ, Vrtková A, Procházka V, Gumulec J, et al. Quantitative Morphology of Cerebral Thrombi Related to Intravital Contraction and Clinical Features of Ischemic Stroke. *Stroke* 2020;51:3640–50. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.031559>.
83. Kovalenko TA, Giraud M-N, Eckly A, Ribba A-S, Proamer F, Fraboulet S, et al. Asymmetrical Forces Dictate the Distribution and Morphology of Platelets in Blood Clots. *Cells* 2021;10:584. <https://doi.org/10.3390/cells10030584>.
84. Dunster JL, Unsworth AJ, Bye AP, Haining EJ, Sowa MA, Di Y, et al. Interspecies differences in protein expression do not impact the spatiotemporal regulation of glycoprotein VI mediated activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2020;18:485–96. <https://doi.org/10.1111/jth.14673>.
85. Martyanov AA, Balabin FA, Dunster JL, Panteleev MA, Gibbins JM, Sveshnikova AN. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling. *Biophysical Journal* 2020;118:2641–55. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.023>.
86. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* 2013;121:1875–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457739>.

Как избежать ошибок при статистическом анализе биологических экспериментов с помощью простого симулятора многоуровневых данных

В.В. Александрова^{1*}, М.Н. Анисимов^{1,2*}, И.А. Ельцов^{3*}, А.П. Килина^{2*}, Ю.Н. Лопанская^{1*}, Л.О. Макарова^{3*}, М.А. Вовченко^{3*}, Н.Б. Гудимчук^{1,2,4#}

1. Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии, Российской Академии Наук, Москва, Россия;
2. Физический факультет, Московский Государственный Университет, Москва, Россия;
3. Московский Физико-Технический Институт (Национальный Исследовательский Университет), Долгопрудный, Россия;
4. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии, Онкологии и Иммунологии имени Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия.

Адрес для переписки: gudimchuk@phys.msu.ru

* авторы сделали одинаковый вклад в работу

Аннотация

Несмотря на обширную литературу по статистическим методам и их корректному применению при обработке биологических данных, неправильный анализ остается критической и широко распространенной ошибкой в исследовательских работах. По своей сути иерархическая (вложенная, кластерная) структура биологических данных часто ошибочно игнорируется, что приводит к псевдорепликации и ложноположительным результатам. Это, в свою очередь, затрудняет правильную оценку статистической мощности и ухудшает оптимальное планирование экспериментов. Чтобы привлечь внимание к этой проблеме и проиллюстрировать важность прямого учета многоуровневой структуры биологических данных, в этой статье мы представляем простой симулятор двухуровневых нормально распределенных стохастических данных с открытым исходным кодом. Задавая «истинные» средние значения и «истинные» внутрикластерные и межкластерные дисперсии смоделированных данных, пользователи симулятора могут проверять различные сценарии, оценивать как важность использования правильного многоуровневого анализа, так и опасность пренебрежения информацией о структуре данных. Здесь мы применяем наш симулятор многоуровневых данных, чтобы обратить внимание на некоторые часто возникающие ошибки при анализе данных и предложить процедуру, которую наш симулятор может использовать для правильного сравнения двух иерархических групп экспериментальных данных и для оптимального планирования

новых экспериментов с целью увеличения статистической мощности при необходимости.

Ключевые слова: многоуровневые данные, статистический анализ, р-значение, ложноположительный результат, ложноотрицательный результат, статистическая мощность, смоделированные данные, внутрикластерная корреляция

Введение

В биологических экспериментах часто приходится иметь дело с «кластеризованными» или «многоуровневыми» данными. Под этими терминами мы подразумеваем иерархическую группировку отдельных измерений по определенному принципу так, что точки данных в каждом кластере не являются полностью независимыми друг от друга (рис. 1). Представьте себе сценарий, когда какое-то измерение повторяется в течение нескольких экспериментальных дней. Несмотря на попытки экспериментатора каждый раз воспроизводить одни и те же условия, на практике реальные условия могут незначительно изменяться изо дня в день. Следовательно, значения, собранные в определенный день, могут больше коррелировать друг с другом, чем с точками из других дней. Такая группировка данных по дням является одним из распространенных примеров иерархической структуры данных в биологических экспериментах. Другим распространенным примером является сценарий, когда несколько точек данных собираются от маленького количества животных, пациентов, клеток и т. д. В этом случае измерения

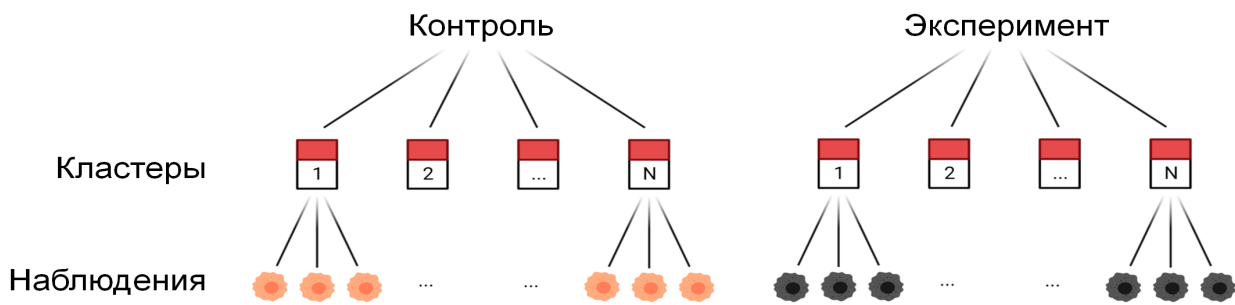


Рисунок 1. Схема дизайна биологического эксперимента с многоуровневыми данными

от одного и того же животного / пациента / клетки могут не быть полностью независимыми, поэтому они образуют кластеры со слегка сдвинутыми средними значениями.

К сожалению, исследователи нередко игнорируют иерархическую структуру своих экспериментальных данных. В этом случае исследователь наивно объединяет все точки данных, собранные при определенных условиях тестирования, предполагая (часто ошибочно!), что они независимы. Затем объединенные данные обычно обрабатываются вместе с использованием некоторых стандартных статистических критериев и методов, таких как *t*-критерий, регрессионный анализ, ANOVA и т. д., которые применимы только для независимых данных. Рассмотрение статистически зависимых данных как статистически независимых создает проблему псевдорепликации [1]. Это искусственно увеличивает размер выборки и приводит к невоспроизводимым или лишеным смысла результатам. Из-за псевдорепликации статистический анализ проверяет неверную гипотезу вместо той, которую исследователь действительно намеревался рассмотреть [2]. Эта проблема описана в нескольких обзорах [2, 3, 4]. Отличительной чертой псевдорепликации является слишком малое *p*-значение, полученное в статистических тестах, даже несмотря на значительное перекрытие значений из сравниваемых групп [5].

Помимо проблемы ложно положительных результатов, неправильная статистическая обработка данных и игнорирование их многоуровневой структуры также могут увеличить вероятность ложноотрицательных результатов. Например, можно было бы наивно ожидать, что простое добавление дополнительных данных от каждой клетки / животного / пациента / дня должно повысить статистическую мощность анализа. Это не всегда правдиво в случае многоуровневых данных. Поэтому тщательный

анализ кластеризации данных очень важен как для оптимального планирования экспериментов, так и для достоверной статистической оценки биологических измерений [1, 3].

Правильная обработка многоуровневых биологических данных требует многоуровневого статистического анализа [6]. Для его реализации были разработаны различные программные пакеты, включая коммерческий инструмент Prism GraphPad [7] и бесплатные программы, такие как InVivoStat [8], разработанные специально для планирования и анализа экспериментов с животными. В многоуровневом анализе данные сравниваются на уровне средних значений кластера с учетом разницы между дисперсией внутри кластеров и дисперсией между кластерами. Этот подход объясняет часть вариативности экспериментального эффекта и обеспечивает наибольшую статистическую мощность. Многоуровневый анализ не только обеспечивает правильную статистическую интерпретацию результатов и, следовательно, правильные выводы, но также может предоставить уникальную информацию о собранных данных исследования, которую невозможно получить при использовании стандартных статистических методов для отдельных значений или для сводной статистики [5, 6].

Здесь мы представляем простой симулятор данных с открытым исходным кодом, чтобы проиллюстрировать общие проблемы, возникающие при статистическом анализе сгруппированных биологических данных. Мы показываем, как ложные предположения о независимости данных могут привести к неправильной оценке статистической значимости разницы между сравниваемыми группами и как этот результат зависит от степени внутрикластерной корреляции (ICC) данных. Используя наш симулятор, мы также демонстрируем, как статистическая мощность анализа изменяется в зависимости от количества кластеров и

количества элементов в них, и предлагаем алгоритм обработки многоуровневых данных и планирования оптимальных экспериментальных измерений.

Методы

Генерация стохастических многоуровневых данных

Мы разработали программу, которая генерирует две нормально распределенные стохастические переменные: «контроль» (x) и «эксперимент» (y), каждая из которых содержит N кластеров данных n наблюдениями на кластер. Случайные переменные, представляющие «контрольные» и «экспериментальные» значения, генерируются следующим образом:

$$\begin{aligned} x(i, j) &= x_{mean}^{intra}(i) + \sigma^{intra} R(0, 1), \\ y(i, j) &= y_{mean}^{intra}(i) + \sigma^{intra} R(0, 1), \end{aligned} \quad \text{Eq. 1}$$

где i – номер кластера от 1 до N ; j – номер измерения от 1 до n ; $x_{mean}^{intra}(i)$ среднее значение «контрольных» данных в i -ом кластере; $y_{mean}^{intra}(i)$ – среднее значение «экспериментальных» данных в i -ом кластере; σ_{intra}^2 – внутри кластерная дисперсия; $R(0,1)$ – случайное нормально распределенное число со средним значением 0 и стандартным отклонением 1.

Внутрикластерные значения, $x_{mean}^{intra}(i)$ и $y_{mean}^{intra}(i)$, определяются как:

$$\begin{aligned} x_{mean}^{intra}(i) &= x^{true} + \sigma^{inter} R(0, 1), \\ y_{mean}^{intra}(i) &= y^{true} + \sigma^{inter} R(0, 1), \end{aligned} \quad \text{Eq. 2}$$

где x^{true} и y^{true} – «истинные» средние значения «контроля» и «эксперимента»; σ_{inter}^2 – межкластерная дисперсия; $R(0,1)$ – случайное нормально распределенное число со средним значением 0 и стандартным отклонением 1.

Статистическое сравнение «контрольной» и «экспериментальной» групп

Симулятор обрабатывает наборы стохастических данных, используя три метода для проверки нулевой гипотезы о равенстве значений в «контроле» и «эксперименте».

Метод 1: n значений из всех N кластеров объединяются, чтобы сформировать два пула значений: «контроль» и «эксперимент». Затем пулы сравниваются с использованием стандартного непарного двустороннего t -критерия, основанного на оценке t_1 :

$$t_1 = \frac{|\langle x \rangle - \langle y \rangle|}{s \sqrt{\frac{2}{M}}}, \quad \text{Eq. 3}$$

где треугольные скобки обозначают усреднение, $M = N \cdot n$ – общий размер набора данных, а s – объединенное стандартное отклонение, определяемое как:

$$s = \sqrt{\frac{(M-1) \cdot SD_x^2 + (M-1) \cdot SD_y^2}{2M-2}}, \quad \text{Eq. 4}$$

где SD_x и SD_y – стандартные отклонения значений в объединенных «контрольной» и «экспериментальной» группах, соответственно.

Затем, p -значение вычисляется из t -распределения с $h = 2M - 2$ степенями свободы при уровне значимости 0,05.

Метод 2: усредняются наблюдения в каждом кластере. Средние значения из каждого кластера используются в качестве входных данных для стандартного непарного t -критерия, основанного

$$t_2 = \frac{|\langle x \rangle - \langle y \rangle|}{s_{mean} \sqrt{\frac{2}{N}}} \quad \text{Eq. 5}$$

здесь треугольные скобки обозначают усреднение, N – количество кластеров, s_{mean} – скомбинированное стандартное отклонение средних значений каждого кластера:

$$s_{mean} = \sqrt{\frac{(N-1) \cdot SD_{x_{mean}}^2 + (N-1) \cdot SD_{y_{mean}}^2}{2N-2}}, \quad \text{Eq. 6}$$

где $SD_{x_{mean}}$ и $SD_{y_{mean}}$ – стандартные отклонения внутрикластерных средних значений в «контрольной» и «экспериментальной» группах соответственно.

p -значение находится так же, как и в первом методе, за исключением того, что теперь степени свободы уменьшены до $h = 2N - 2$.

Метод 3: многоуровневая структура наборов данных учитывается путем вычисления скорректированной статистики непарного

$$t_3 = c \cdot t_1, \quad \text{Eq. 7}$$

где c поправочный коэффициент для t -распределения:

$$c = \sqrt{\frac{(M-2) - 2(n-1) \cdot ICC}{(M-2)(1 + (n-1) \cdot ICC)}}, \quad \text{Eq. 8}$$

где M – общее количество данных, n – количество значений на кластер, ICC – внутрикластерная корреляция, вычисляемая как:

$$ICC = \frac{\sigma_{inter}^2}{\sigma_{inter}^2 + \sigma_{intra}^2}, \quad \text{Eq. 9}$$

Модифицированное p -значение теперь определяется с помощью t_3 -распределения из уравнения (6) с h степенями свободы, вычисляемыми следующим образом:

$$h = \frac{((M-2) - 2(n-1) \cdot ICC)^2}{(M-2)(1 - ICC)^2 + n(M-2n) \cdot ICC^2 + 2(M-2n) \cdot ICC \cdot (1 - ICC)}. \quad \text{Eq. 10}$$

Анализ статистической мощности

При условии, что истинные значения «контроля» и «эксперимента» различны, программа так же вычисляет статистическую мощность, достигаемую каждым методом при заданном наборе параметров моделирования. Для этого стохастическое моделирование повторяется 1000 раз. При уровне значимости 0,05 нулевая гипотеза о равенстве средних отклоняется

или принимается на основе вычисленных р-значений в каждом из 1000 запусков. Мощность определяется как процент случаев, в которых ложноотрицательный результат не получен.

Доступность кода

Симулятор многоуровневых данных доступен по адресу https://github.com/juliaLopanskaia/nested_data_simulator.

Результаты

Не объединяйте данные в пул при наличии корреляции внутри кластера

В первую очередь применим наш симулятор случайных многоуровневых данных для того, чтобы проиллюстрировать важность учета кластеризации данных. Предположим, что необходимо провести исследование равенства значений некоторой величины при двух различных условиях (“контроль” и “эксперимент”); здесь и везде в дальнейшем нулевая гипотеза состоит в равенстве этих значений). Для этого мы сгенерируем 50 условных “измерений” для каждого из трех кластеров. В первом примере мы будем генерировать данные таким образом, чтобы истинные значения при каждом условии были равны, так что не существует никакой разницы между “контролем” и “экспериментом”. Как описано в разделе Методы, наш симулятор многоуровневых данных заполняет каждый кластер случайными данными с нормальным распределением, которые генерируются так, чтобы пользователем было получено определенное среднее значение и внутрикластерная дисперсия σ_{intra}^2 . Пользователь также определяет межкластерную дисперсию, σ_{inter}^2 , описывающую степень разброса средних значений между кластерами.

В зависимости от дисперсий между кластерами и внутри них наблюдения могут быть более или менее независимыми друг от друга. Внутрикластерная корреляция (ICC) служит удобной метрикой для определения степени относительного сходства наблюдений из одного и того же кластера (Ур. 9).

Рассмотрим два случая: (1) смоделированные данные имеют слабую относительную корреляцию внутри кластеров (ICC = 0,01, рис. 2А) и (2) смоделированные данные имеют сильную относительную корреляцию внутри кластеров (ICC = 0,2, рис. 2Б).

Чтобы продемонстрировать некоторые подводные камни статистического анализа, мы можем оценить три способа обработки этих данных: 1) наивно объединяя наблюдения из всех кластеров по условию и используя непарный t-критерий для сравнения двух условий; 2)

вычисляя средние значения для каждого кластера и обрабатывая их непарным t-критерием; 3) используя модифицированный непарный t-критерий, учитывающий многоуровневую структуру данных [10].

Когда наблюдения почти независимы (ICC = 0,01, рис. 2А), все три способа статистической обработки данных выдают одинаково высокие р-значения. Это указывает очень высокую вероятность того, что нулевая гипотеза о равенстве средних верна. Такой результат является правильным, поскольку мы знаем, что “истинные” значения действительно были определены пользователем как равные.

Однако в случае сильной внутрикластерной корреляции (ICC = 0,2, рис. 2Б) три статистические обработки приводят к различным результатам. В частности, самый наивный подход объединения всех точек данных вместе и проведения стандартного непарного t-теста дает чрезвычайно маленькое р-значение. Ошибочно это может быть истолковано как указание на то, что “контроль” и “эксперимент” существенно отличаются. Очевидно, что в нашем смоделированном сценарии это не так, поэтому этот тип анализа показывает, как игнорирование многоуровневой структуры данных может привести к ложноположительному результату. Вторая статистическая процедура, то есть усреднение всех наблюдений внутри каждого кластера, а затем использование внутрикластерных средних значений для проведения t-теста, работает лучше и не приводит к неправильному отклонению нулевой гипотезы. Наконец, последняя из рассмотренных статистических процедур так же указывает в пользу нулевой гипотезы о равенстве средних.

Чтобы более наглядно показать важность учета кластеризации данных, мы построили график зависимости вероятности получения ложноположительного результата от степени внутрикластерной корреляции ICC (рис. 2В). Этот график показывает, что наивный подход объединения всех данных вместе резко увеличивает вероятность ложно положительных результатов, в то время как два других статистических метода обработки дают более точные результаты в этом случае. Тепловая карта на рис. S1 показывает, как вероятность получения ложноположительного результата зависит от количества кластеров и количества наблюдений в каждом кластере.

Как правильно спланировать эксперимент и скорректировать обработку данных для выявления истинной разницы между сравниваемыми группами?

Мы надеемся, что из смоделированного нами примера, описанного в предыдущем разделе, ясно, что объединение измерений из всех кластеров в один пул и рассмотрение их как независимых наблюдений, вероятно, приведет к ложноположительным результатам, если внутрикластерная корреляция будет выше 0,01. Поэтому важно распознавать многоуровневую структуру данных и, либо вычислять средние значения данных внутри кластеров для

проведения их статистического анализа, либо использовать модифицированный непарный t-критерий.

Но если последние два метода дают сопоставимые показатели ложноположительных результатов, есть ли на самом деле предпочтение в использовании того или иного метода? Чтобы ответить на этот вопрос, мы теперь смоделируем другой сценарий, в котором и “контроль”, и

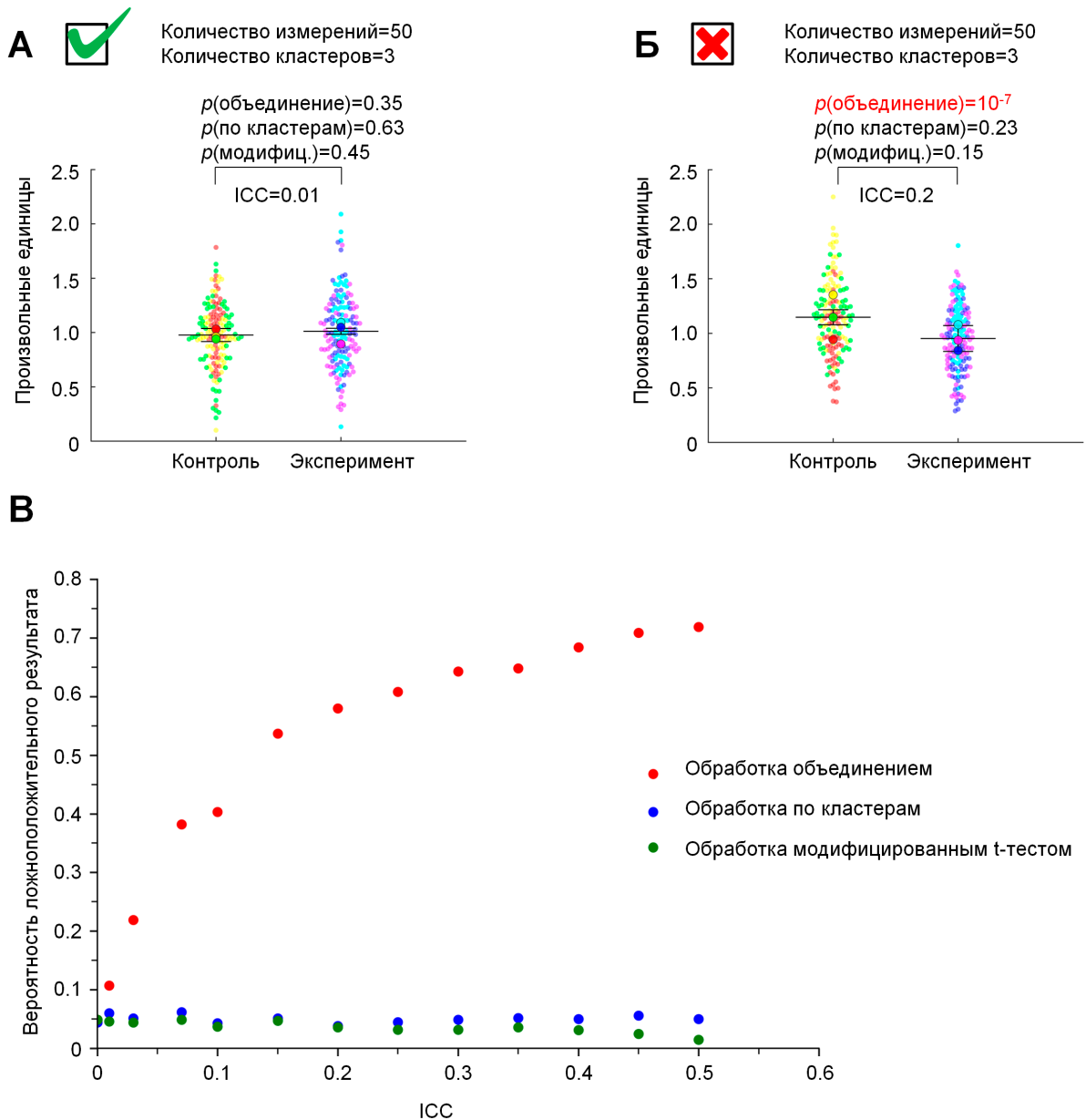


Рисунок 2. Анализ примера смоделированных многоуровневых данных с равными средними значениями в “контрольной” и “экспериментальной” группах. Число наблюдений в кластере 50, число кластеров 3. Во всех случаях истинные средние значения в “контроле” и “эксперименте” равны (1,0 отн.ед.). (А) Слабая внутрикластерная корреляция (ICC = 0,01). Внутрикластерная дисперсия: 0,3 отн.ед., межкластерная дисперсия: 0,03 отн.ед. Разные цвета обозначают разные кластеры. Числа над графиками показывают три вычисленных r-значения, как описано в разделе Методы. Центральные линии и диапазон ошибок показывают среднее значение и стандартную ошибку среднего. (Б) Сильная внутрикластерная корреляция (ICC = 0,2). Внутрикластерная дисперсия: 0,3 отн.ед., межкластерная дисперсия: 0,15 отн.ед. Игнорирование кластеризации данных в этом случае приводит к ложноположительному результату. Разные цвета обозначают разные кластеры. Числа над графиками показывают три вычисленных r-значения, описанных в разделе Методы. Центральные линии и диапазон ошибок показывают среднее значение и стандартную ошибку среднего. (В) Зависимость вероятности получения ложноположительного результата от ICC при объединении всех данных (красные точки), использовании средних для каждого кластера (синие точки) и применении модифицированного t-критерия (зеленые точки). Можно видеть, что при сильной кластеризации “неправильная” обработка (объединение данных из всех кластеров) значительно увеличивает вероятность ложноположительного результата. В то же время использование средних значений для каждого кластера или модифицированного t-критерия значительно снижает вероятность получения ложноположительного результата.

“эксперимент” представлены тремя кластерами данных, но “истинные” значения в “контроле” и “эксперименте” немного отличаются (рис. 3А, Б). Какой тип статистического анализа обеспечит меньшую вероятность ложноотрицательного результата?

Начнем с примера, в котором объем данных ограничен: только $n = 5$ наблюдений на кластер и только $N = 3$ кластера на условие. Многократно запустив наш симулятор многоуровневых данных с фиксированными пользовательскими параметрами, легко вычислить вероятность получения ложноотрицательного результата β . Соответствующая статистическая мощность (%) определяется как $(1 - \beta) \cdot 100\%$. Из моделирования становится ясно, что мощность выше, когда одни и те же данные оцениваются с помощью модифицированного t -критерия, по сравнению с t -тестом, основанным на средних значениях по кластерам (рис. 3А, Б). Этот небольшой, но воспроизводимый прирост статистической мощности позволяет более надежно обнаруживать небольшие различия между “контролем” и “экспериментом”. Обратите внимание, что при использовании обоих методов статистическая мощность ниже в случае, если данные имеют более высокий ICC.

Вероятность получения ложноотрицательного результата зависит как от количества измерений в кластере, так и от количества кластеров (рис. S2). Таким образом, для повышения чувствительности обработки данных необходимо увеличить количество измерений в каждом кластере и/или количество кластеров. На практике, однако, обычно трудно увеличить количество кластеров (т. е. количество организмов / пациентов / клеток / экспериментальных дней). Поэтому для снижения вероятности получения ложноотрицательного результата проще (а иногда и целесообразнее) увеличить количество измерений внутри кластера. На рис. 3В, Г показаны примеры, в которых количество наблюдений на кластер увеличивается в 10 раз по сравнению с рис. 3А, Б. Как видно, в этом случае статистическая мощность действительно увеличивается, но выигрыш выше при низком ICC (рис. 3В), в то время как при более высоком ICC увеличение статистики внутри каждого кластера не оказывает такого сильного эффекта (рис. 3Г). Добавление большего количества кластеров обычно является более эффективным способом повышения статистической мощности, как показывают смоделированные примеры на рис. 3Д, Е, в которых число кластеров увеличивается в 5 раз по сравнению со случаем, рассмотренным на рис. 3А, Б. На практике исследователи должны делать выбор между добавлением большего количества наблюдений на кластер и добавлением

нескольких кластеров, основываясь на понимании ожидаемого прироста мощности (рис. S2) и других факторов, таких как время, стоимость и усилия, необходимые для сбора каждого типа данных.

В любом случае, подробное описание результатов статистического анализа имеет важное значение для правильной интерпретации исследования. К наиболее оптимальным способам отображения результатов статистических сравнений можно отнести визуализацию данных в виде более информативных графиков (SuperPlots) [5] и предоставление всех деталей о статистическом анализе, таких как формулировка проверяемой нулевой гипотезы; описание используемого статистического метода; указание размера выборки и типа вычисляемого p -значения (односторонний или двусторонний). Помимо статистической значимости, следует также сообщать о значительности различий (т.е. о «размере эффекта» [11]).

Как правильно обрабатывать многоуровневые данные?

В этом заключительном разделе мы предлагаем возможный план экспериментальной обработки, задействующей наш симулятор многоуровневых данных (рис. 4). Он применим, когда экспериментатор стремится сравнить средние значения некоторой величины в двух экспериментальных условиях, которые создают данные с иерархической структурой, такие как наблюдения из разных клеток / организмов / пациентов / экспериментальных дней. Мы предлагаем осуществить исследование следующим образом. Во-первых, следует провести пилотный набор измерений для получения двух минимальных наборов данных ($N = 3$ кластера, $n = 10-20$ наблюдений на кластер). Имея эти данные, можно оценить средние значения, дисперсии в каждом кластере и дисперсии средних между кластерами.

Заметим, что для простоты мы рассматриваем только тот случай, когда данные распределены нормально и дисперсии в контрольной и экспериментальной группах существенно не различаются. Так часто бывает с реальными данными, что оправдывает применение t -теста. Если данные не подчиняются нормальному распределению, то могут быть применены непараметрические тесты, такие как U -критерий Манна-Уитни-Уилкоксона [12]. Принимая средние значения и дисперсии из пилотного эксперимента в качестве входных параметров для моделирования, наш симулятор многоуровневых данных может быть использован для оценки статистической мощности пилотного эксперимента. Допустимое и традиционно используемое значение для

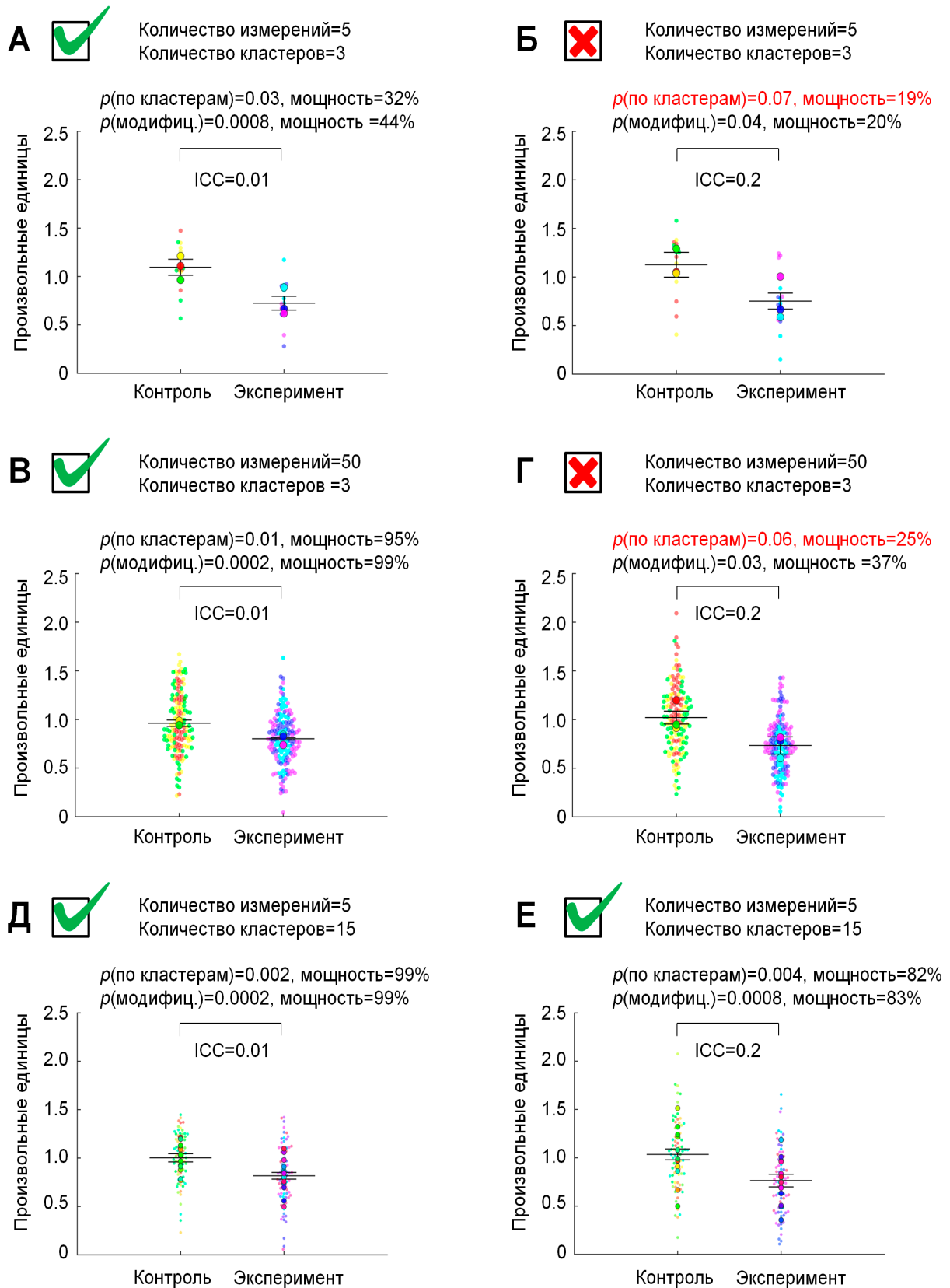


Рисунок 3. Анализ статистической мощности экспериментов с различной внутрикластерной корреляцией, количеством наблюдений и кластеров. Во всех случаях истинные значения в “контроле” и “эксперименте” различны и равны 1,0 и 0,8 отн.ед. соответственно. Разные цвета обозначают разные кластеры. Числа над графиками показывают p -значения и степени, вычисленные в соответствии с описанием в разделе Методы. Центральные линии и диапазон ошибок показывают среднее значение и стандартную ошибку среднего. (А) Слабая внутрикластерная корреляция (ICC = 0,01). (Б) Сильная внутрикластерная корреляция (ICC = 0,2). Количество измерений в каждом кластере 5, количество кластеров 3. (В-Е) Статистика увеличивается путем добавления измерений в каждом кластере (В, Г) или кластерах (Д-Е). Ложноотрицательные случаи, связанные с низкой мощностью, показаны в Б и Г. Во всех случаях (В-Е) отображаемая мощность немного меньше при использовании обработки средних значений для каждого кластера и обычного t -критерия по сравнению с использованием модифицированного t -критерия. Обработка данных (А-Е) проводилась с использованием средних значений для каждого кластера и t -критерия, основанного на средних значениях для каждого кластера, или с использованием модифицированного t -теста.

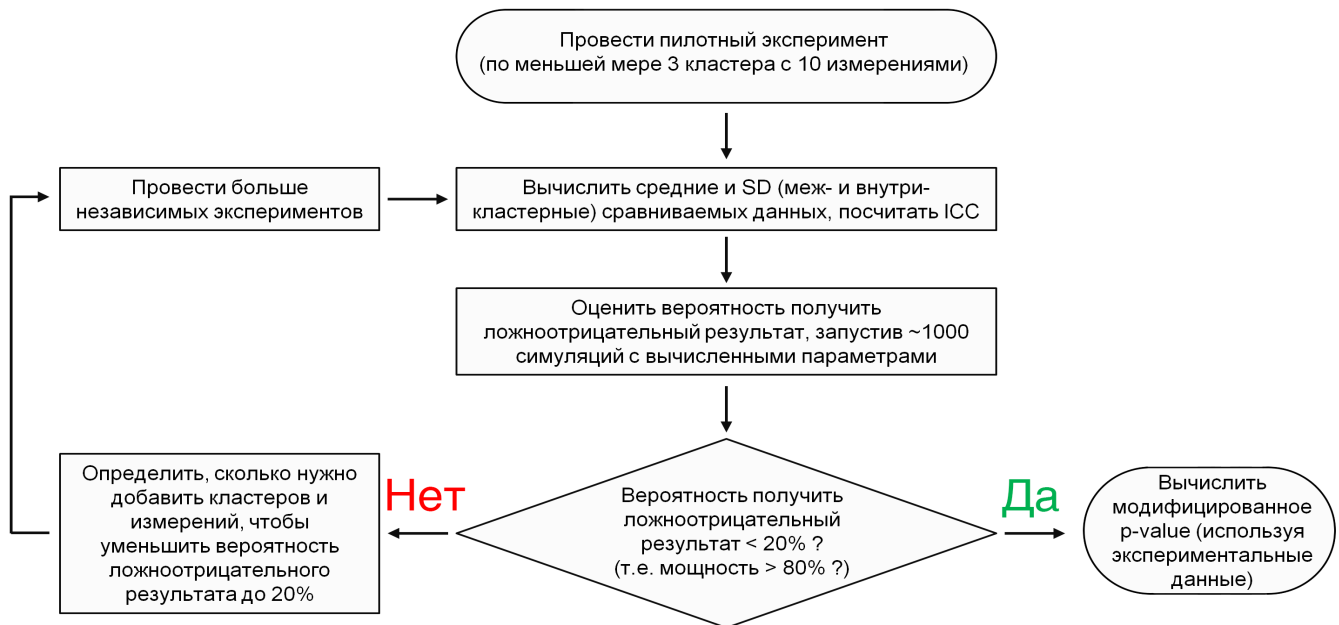


Рисунок 4. Предлагаемый алгоритм для оптимального планирования эксперимента и обработки данных.

не требуется. Пользователь может просто использовать p -значения из модифицированного t -критерия, выведенные симулятором, чтобы отклонить или принять нулевую гипотезу о равенстве средних. Если p -значение ниже некоторого порога α , то “эксперимент” статистически отличается от “контроля” с уровнем значимости $1 - \alpha$.

Если расчетная мощность пилотного эксперимента ниже 80%, мы предлагаем использовать симулятор для прогнозирования того, сколько новых кластеров (N) (т. е. животных / клеток / пациентов / экспериментальных дней) или сколько наблюдений на кластер (n) следует добавить, чтобы увеличить мощность до требуемого уровня. Это можно сделать, просто запустив симулятор многоуровневых данных со средними и отклонениями, оцененными по результатам пилотного эксперимента, но увеличивая число кластеров и наблюдений внутри кластеров до тех пор, пока не будет получен удовлетворительный результат. После того как будет найдена хорошая комбинация, следует провести дополнительные измерения и добавить их к уже существующим данным. Затем новые средние значения и отклонения должны быть оценены в “контрольных” и “экспериментальных” наборах данных, и цикл обработки повторяется заново (рис. 4). Мы предполагаем, что такой алгоритм обеспечит максимальную эффективность, высокую статистическую мощность и правильную оценку значимости разницы средних в “контрольных” и “экспериментальных” условиях.

Заключение

Одной из сильных сторон такого простого симулятора, как наш, является способность четко проиллюстрировать, как неверные неявные или явные предположения о независимости данных могут привести к неправильному использованию статистических процедур, приводя к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Эти подводные камни особенно очевидны, потому что в смоделированных данных “истинные” ответы известны. По нашему опыту, такого рода упражнения с использованием симулятора многоуровневых данных помогают натренировать интуитивное мышление о статистических методах. Но помимо простой иллюстрации широко распространенных ошибок, симулятор может быть непосредственно включен в экспериментальный процесс, чтобы помочь исследователям планировать и правильно анализировать свои эксперименты. Мы надеемся, что с помощью нашего простого симулятора многоуровневых данных нам удалось привлечь внимание к старой и важной проблеме статистического анализа иерархических биологических данных и убедить читателей в важности учета структуры данных.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-1869.2020.4.

Авторские вклады

В. В. А., М. Н. А., И. А. Е., А. П. К., Ю. Н. Л., Л. О. М., М. А. В. проводили исследования и писали первоначальный проект рукописи, Н. Б. Г. проектировал исследования, получал финансирование и редактировал рукопись.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что никакого конфликта интересов нет.

Список литературы

1. S. H. Hurlbert, 'Pseudoreplication and the Design of Ecological Field Experiments', *Ecological Monographs*, vol. 54, is. 2, pp. 187-211, Jun. 1984, doi:10.2307/1942661
2. S. E. Lazic, 'The problem of pseudoreplication in neuroscientific studies: is it affecting your analysis?', *BMC Neurosci.*, vol. 11, p. 5, Jan. 2010, doi: 10.1186/1471-2202-11-5.
3. S. E. Lazic, C. J. Clarke-Williams, and M. R. Munafò, 'What exactly is "N" in cell culture and animal experiments?', *PLoS Biol.*, vol. 16, no. 4, Apr. 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2005282.
4. J. P. Dorman, 'The effect of clustering on statistical tests: an illustration using classroom environment data', *Educational Psychology*, vol. 28, no. 5, pp. 583–595, Aug. 2008, doi: 10.1080/01443410801954201.
5. Lord SJ, Velle KB, Mullins RD, Fritz-Laylin LK. 'SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology.', *J Cell Biol.* 2020 Jun 1, 219(6):e202001064, doi: 10.1083/jcb.202001064.
6. E. Aarts, C. V. Dolan, M. Verhage, and S. van der Sluis, 'Multilevel analysis quantifies variation in the experimental effect while optimizing power and preventing false positives', *BMC Neurosci.*, vol. 16, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12868-015-0228-5.
7. <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>
8. S. T. Bate, R. A. Clark, and S. C. Stanford, 'Using InVivoStat to perform the statistical analysis of experiments', *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.*, vol. 31, no. 6, pp. 644–652, Jun. 2017, doi: 10.1177/0269881116682213.
9. J. K. Haseman and M. D. Hogan, 'Selection of the experimental unit in teratology studies', *Teratology*, vol. 12, no. 2, pp. 165–171, Oct. 1975, doi: 10.1002/tera.1420120209.
10. L. V. Hedges, 'Correcting a Significance Test for Clustering', *J. Educ. Behav. Stat.*, vol. 32, no. 2, pp. 151–179, Jun. 2007, doi: 10.3102/1076998606298040.
11. G. M. Sullivan and R. Feinn, 'Using Effect Size— or Why the P Value Is Not Enough', *J Grad Med*

Educ, vol. 4, no. 3, pp. 279–282, Sep. 2012, doi: 10.4300/JGME-D-12-00156.1

12. B. Rosner and D. Grove, 'Use of the Mann–Whitney U-test for clustered data', *Statistics in Medicine*, vol. 18, no. 11, pp. 1387–1400, 1999, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19990615\)18:11<1387::AID-SIM126>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19990615)18:11<1387::AID-SIM126>3.0.CO;2-V).
13. J. Cohen and B. B. Wolman, 'Handbook of clinical psychology' McGraw-Hill New York, pp. 95-121, 1965.

Прямое взаимодействие STIM1-ORAI1 не может управлять депо-управляемым входом кальция (SOCE) в тромбоцитах

А.К. Гарсон Дасгупта^{1,2#}

1. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия
2. Физический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Автор для переписки: garzon.ak15@physics.msu.ru

Аннотация

Депо-управляемый вход кальция (SOCE) играет важную роль в функционировании тромбоцитов. Считается, что механизм SOCE основан на прямом взаимодействии белков STIM1 и ORAI1 со специфической стехиометрией STIM1:ORAI1. Однако в тромбоцитах может осуществляться другой путь. Целью данной работы было исследование механизмов SOCE в тромбоцитах. Мы разработали решеточную математическую модель, которая отражает взаимодействие STIM1-ORAI1, и применили ее как к клеткам HEK, где механизм SOCE хорошо установлен, так и к тромбоцитам. Модель смогла успешно описать поведение STIM1-ORAI1 в клетках HEK. Мы использовали те же параметры для взаимодействия белков и применили их к тромбоцитам. В результате мы продемонстрировали, что количество белков STIM1 на мембране ЭПР не может обеспечить необходимую стехиометрию для правильного депо-управляемого входа кальция в тромбоцитах.

Ключевые слова: Внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах, Депо-Управляемый вход кальция, Математическое моделирование, Тромбоциты

Введение

Тромбоциты играют важную роль в гемостазе, поскольку предотвращают потерю крови при повреждении стенки сосуда [1]. Это достигается за счёт их активации, последующей агрегации и образования тромба. Хорошо известно, что эти процессы в основном определяются динамикой внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} [2]. Существуют два главных источника свободных ионов кальция, обеспечивающих своевременный ответ на активацию: внутриклеточные запасы (представленные

эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР)) и Ca^{2+} внеклеточной среды [3], [4]. Основным механизмом поступления ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в тромбоцитах является депо-управляемый вход кальция (SOCE), который запускается истощением хранилищ/депо.

Главным механизмом SOCE является система, состоящая из двух белков: сенсора кальция на мембране ЭПР – STIM1 [5] и высокоселективного канала для ионов кальция на плазматической мембране (ПМ) – ORAI1 [6]. STIM1 и ORAI1 в тромбоцитах влияют на образование тромбов, прокоагулянтную активность и активацию тромбоцита через рецептор GPVI [7].

Существуют несколько возможных механизмов депо-управляемого входа кальция в тромбоцитах. Важная роль белков STIM1 и ORAI1 в SOCE хорошо известна [8], [9], однако их взаимодействие, приводящее к входу Ca^{2+} в тромбоциты, все еще остается не до конца ясным. Основным механизмом SOCE считается прямое взаимодействие и конформационное связывание STIM1-ORAI1 [6], [10], [11], что было показано на многих клетках *in vitro*, особенно на клеточной линии HEK293 [12]–[14], где многие аспекты взаимодействия STIM1-ORAI1 были подробно изучены. Цепочка событий следующая: 1) истощение ЭПР приводит к диссоциации ионов Ca^{2+} из EF-ручки STIM1, 2) это вызывает конформационные изменения всего белка и его переход в более растянутое состояние, 3) активированный STIM1 может взаимодействовать с белком ORAI1 в контактах ЭПР-ПМ, если расстояние между двумя мембранами составляет ~15 нм, 4) взаимодействие ORAI1 с STIM1 открывает гексамерные поры (состоящие из ORAI1) и значительно увеличивает проводимость Ca^{2+} . Еще одна интересная особенность данного механизма связывания - стехиометрия, которая приводит к SOCE. Оказывается, что

взаимодействия одного белка STIM1 с порой недостаточно для правильного открытия пор, и по крайней мере 5 белков STIM1 необходимо для инициации входа Ca^{2+} из внешней среды (более подробно см. обзор [15]).

Помимо прямого взаимодействия STIM1-ORAI1 существует альтернативный механизм SOCE. Этот механизм подразумевает наличие промежуточного мессенджера - фактора входа кальция (CIF) [16], природа которого до сих пор неизвестна. Истощение ЭПР и последующая активация STIM1 приводит к образованию CIF [17], который активирует кальций-независимую фосфолипазу A2 (iPLA2), вытесняя ингибирующий кальмодулин из её активного сайта. Активированная iPLA2, в свою очередь, приводит к открытию пор и, как следствие, входу Ca^{2+} . Считается, что открытие пор ORAI1 связано с присутствием лизофосфолипидов, которые являются продуктами активности iPLA2. Этот механизм не подразумевает прямого связывания STIM1-ORAI1, однако близкая локализация белков необходима для быстрой диффузии CIF от ЭПР к ПМ.

Существуют несколько математических моделей депо-управляемого входа кальция [18]–[20]. В работе Schmidt et. al [20] с помощью закона действующих масс рассматриваются процессы олигомеризации, диффузии и кластеризации STIM1-ORAI1. Несмотря на то, что данная модель учитывает межмембранные контакты ЭПР-ПМ, а именно, диффузию белков в эти области, принцип моделирования предполагает большое число молекул. Действительно, такой подход правомерен для больших клеток с большим количеством интересующих белков (например, НЕК, которые использовались в статье для

валидирования данных). Однако это не может быть применено к клеткам со значительно меньшим количеством белков, так как система больше не может считаться гомогенной. Учитывая относительно низкое количество STIM1 в тромбоцитах, разумно использовать другой подход для моделирования SOCE. Одним из таких подходов могут быть решеточные модели [21], где система представлена сеткой ячеек, имеющих конечное число состояний. Каждая ячейка изменяет свое состояние в соответствии с определенным набором правил, которые представляют временную эволюцию системы.

В данной статье мы представляем решеточную модель депо-управляемого входа кальция в тромбоцитах. Мы показываем, что небольшая поверхностная концентрация STIM1 не может обеспечить достаточную стехиометрию для правильного открытия пор и притока Ca^{2+} в клетку.

Методы

Метод моделирования

Модель SOCE определяется двумя дискретными пространственными решетками \mathcal{L} : мембрана ЭПР и ПМ, дискретным пространством состояний ε и динамикой, основанной на локальных правилах.

Регулярная решетка $\mathcal{L} \subset \mathbb{R}^2$ состоит из N узлов $r_i \in \mathcal{L}$, $i = 1, \dots, N$. Каждый узел решетки $b = 8$ ближайших соседей. Каждый узел решетки $r_i \in \mathcal{L}$ соединен со своим ближайшим соседом единичным вектором c_i , $i = 1, \dots, b$. Предполагается, что это окрестность Мура. Кроме того, белок может находиться в состоянии покоя, что

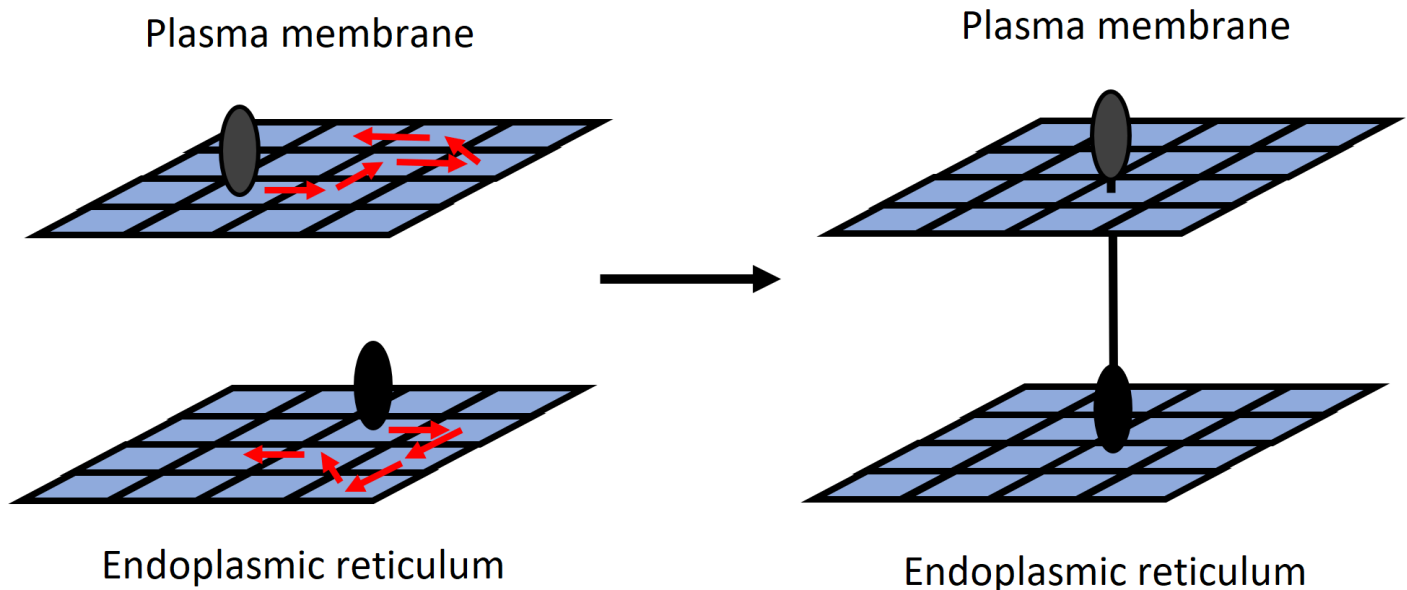


Рисунок 1. Схема взаимодействия STIM1-ORAI1 в модели. Белок STIM1 представлен черным цветом, ORAI1 - серым. Диффузия белков вдоль мембран приводит к их взаимодействию и последующему конформационному связыванию.

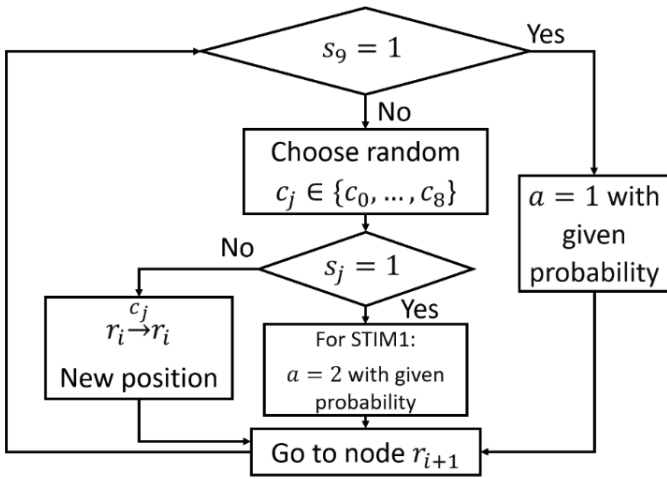


Рисунок 2. Блок-схема алгоритма моделирования.

обозначается как c_0 . Поскольку мы рассматриваем две противоположно лежащие решетки, которые обозначают две мембраны (ЭПР и ПМ), вводится дополнительный единичный вектор c_9 , чтобы отразить заполнение в той же противоположающей ячейке на второй решетке. Параметр $K = b + 1$ определяет возможные варианты перемещения узла.

Пространство состояний определяется числами занятости $s_j \in \{0, 1\}$, $j = 0, \dots, K$. Эти

$$s = (s_1, \dots, s_K) \in \varepsilon = \{0, 1\}^K.$$

числа занятости отражают присутствие ($s_j = 1$) или отсутствие ($s_j = 0$) белка в канале c_j внутри некоторого узла. Тогда конфигурация узла задается вектором состояния:

Сам по себе узел также имеет свойства. В нашей модели STIM1 (ORAI1) может находиться в двух состояниях - свободном, связанном. К тому же STIM1 может входить в состав кластера. Это обозначается параметром $a \in \{0, 1, 2\}$, где $a = 0$ обозначает свободный белок, $a = 1$ – связанный, $a = 2$ – в кластере (для STIM1). Если белок находится в связанном состоянии, он больше не может диффундировать вдоль мембраны (Рис. 1).

Новая конфигурация решетки создается в соответствии с локальным правилом, которое определяет новое состояние каждого узла с точки зрения текущих состояний узла и узлов в его окрестности. Чтобы определить новую конфигурацию решетки, локальное правило применяется последовательно в каждом узле r решетки.

Алгоритм моделирования взаимодействия STIM1-ORAI1 представлен на следующей блок-схеме (Рис.2).

Следует обратить внимание, что мы предполагаем, что близкого расположения белков недостаточно для кластеризации,

Table 1.

Cell	HEK	Platelet
Area (μm^2)	530	70
ER-PM contact site total area (μm^2)	80	unknown ~25
Single contact area (μm^2)	~25-30	unknown
#STIM1	240000	7400
#ORAI1	120000	3700
Probability of STIM1-ORAI1 puncta formation due interaction	0.1-90%	

и они должны «перекрываться», чтобы сформировать кластер. Следовательно, мы рассматриваем кластеризацию как процесс, который происходит, когда один белок имеет тенденцию диффундировать «в» другой белок, а не кластеризоваться из-за близкой локализации.

Начальное состояние каждой мембраны определяется путем случайного размещения узлов на двумерной решетке. Количество узлов для каждой решетки равно количеству белков (STIM1 или ORAI1).

Параметры модели оценивались вручную для соответствия экспериментальным данным. В частности, вероятность образования комплекса STIM1-ORAI1 оценивалась согласно известным характерным временам и максимальному количеству комплексов STIM1-ORAI1, а кластеризация STIM1 согласно известной стехиометрии STIM1: ORAI1 в пределах одного контакта STIM1-ORAI1.

Результаты

Оценка коэффициента диффузии

Наш подход к моделированию похож на моделирование броуновского движения с помощью случайного блуждания. Однако важной отличительной особенностью является то, что

$$D = 0.21 \mu\text{m}^2/\text{s}$$

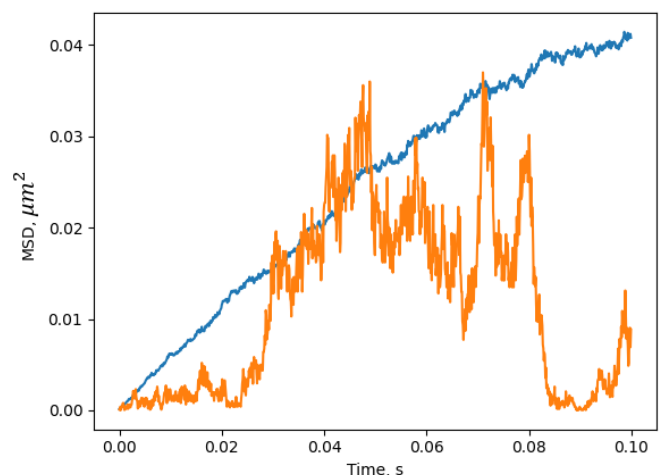


Рисунок 3. Диффузия одиночного белка по решетке. Синий цвет представляет собой СКО для $n = 100$ белков. Оранжевым цветом показаны отдельные СО.

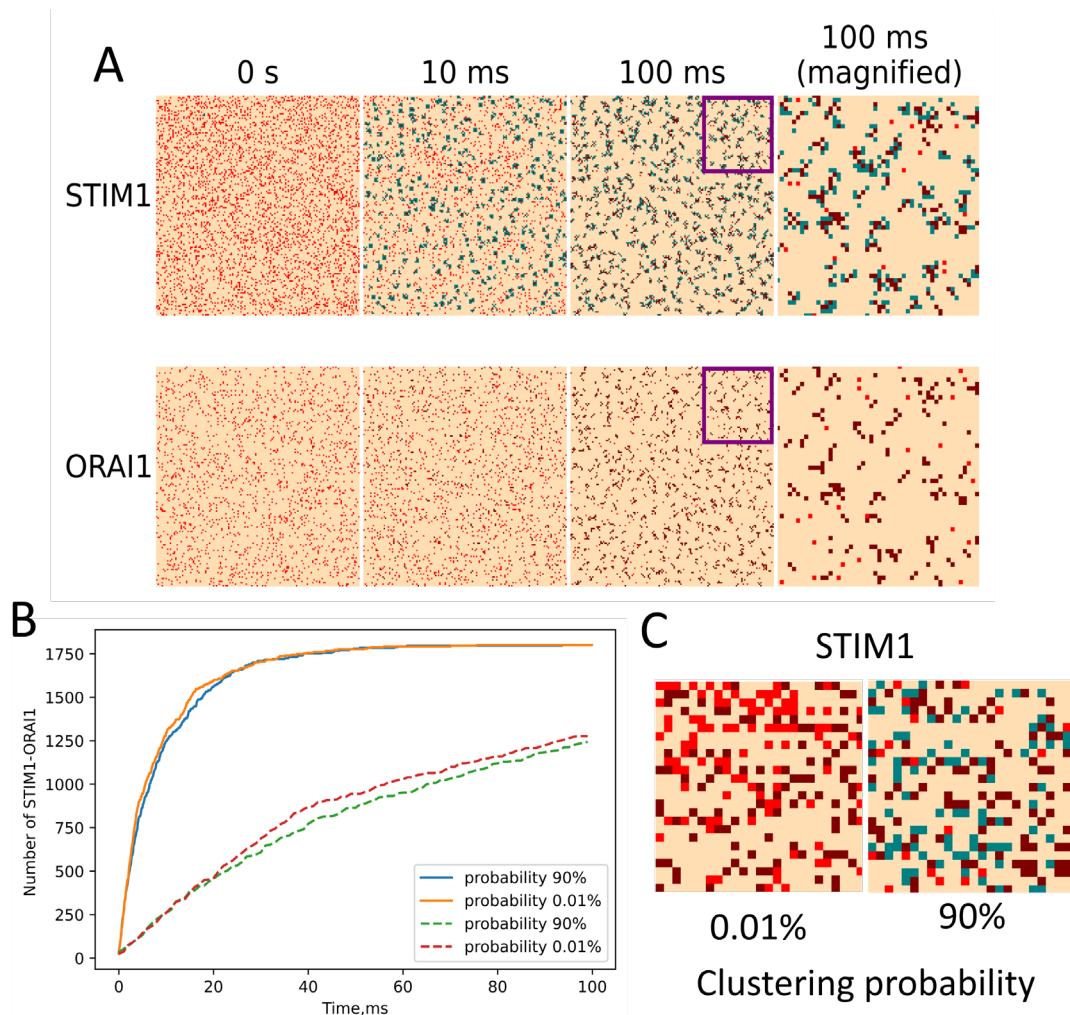


Рисунок 4. (A) Взаимодействие STIM1-ORAI1 для клеток HEK. Связанные белки представлены коричневым цветом, STIM1 в кластере - зеленым, свободные белки - красным. (B) Зависимость формирования контакта STIM1-ORAI1 от вероятности кластеризации. Пунктирные линии представляют тот же процесс для $D = 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (C) Типичное состояние системы при $t=100\text{ms}$ для различных вероятностей кластеризации.

каждый шаг является фиксированным и равным 1 ячейке, тогда как в случайном блуждании этот параметр варьируется. Данное изменение связано с тем, что при моделировании броуновского движения частицы в воде длина свободного пробега частицы намного больше размера самой частицы из-за жидкого агрегатного состояния среды [22]. При моделировании диффузии вдоль мембраны плотность липидов и мембранных белков позволяет пренебречь данным параметром. На Рис.3 показано, что наш подход и параметры для моделирования диффузии дают верную скорость диффузии (в соответствии с [13]) и типичные зависимости среднеквадратичного отклонения (СКО) от времени.

Прямое взаимодействие STIM1-ORAI1 в клетках HEK

Чтобы исследовать механизм SOCE в тромбоцитах, мы сначала применили нашу модель на клетках HEK. Такой подход был выбран по двум причинам: 1) клетки HEK имеют хорошо известные геометрические параметры и количество белков как для всей клетки, так и для

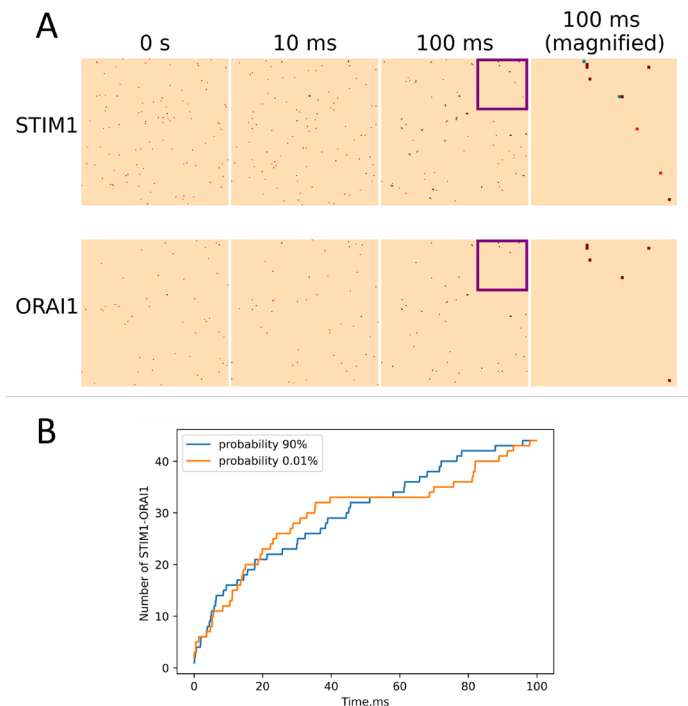


Рисунок 5. (A) Взаимодействие STIM1-ORAI1 для тромбоцитов. Связанные белки представлены коричневым цветом, STIM1 в кластере - зеленым, свободные белки - красным. (B) Зависимость формирования контакта STIM1-ORAI1 от вероятности кластеризации

контактов ЭПР-ПМ, 2) прямое взаимодействие STIM1-ORAI1 в основном исследуется на этом типе клеток, и поэтому существует множество экспериментальных данных, по которым можно оценить работу модели. Параметры для клеток НЕК были взяты из [20] и представлены в таблице 1.

Типичное состояние системы для мембраны ЭПР при $t = 0 \text{ ms}$, 10 ms и 100 ms показано на Рис.4А. Параметры модели были подобраны так, чтобы соответствовать быстрому формированию контактов STIM1-ORAI1 ([20], [23]) а затем последующему росту кластеров. Вероятность кластеризации не оказывает существенного влияния на динамику системы (типичные характерные времена остаются на том же порядке) (Рис. 4В). При гораздо меньшем коэффициенте диффузии ($0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$) resulting dynamics does not change (Fig. 4В, пунктирные линии). конечная динамика системы не изменяется (стационарное состояние остается тем же) (рис. 4В, пунктирные линии). В результате, кластеризация не влияет на общее количество контактов STIM1-ORAI1, однако влияет на стехиометрию и, следовательно, на открытие пор (Рис. 4С).

Моделирование SOCE в тромбоцитах

После оценки параметров взаимодействия STIM1-ORAI1 мы применили нашу модель к тромбоцитам. Мы использовали те же вероятности для кластеризации и связывания, но изменили исходное количество белков на каждой мембране. Оказалось, что низкая концентрация STIM1 не может обеспечить нужную стехиометрию. Типичные состояния системы представлены на Рис. 5А. Также оказалось, что характерное время образования контакта STIM1-ORAI1 увеличено (Fig. 5В).

Обсуждение

В данной работе мы разработали решеточную модель взаимодействия STIM1-ORAI1. Модель смогла верно описать динамику системы в клетках НЕК, и быть в соответствии с экспериментальными данным. Наши результаты также показали, что в клетках НЕК происходит образование перекрестных связей пор ORAI1 с помощью STIM1, что, согласно [24], может изменять свойства проводимости пор.

С другой стороны, в тромбоцитах не только не происходит образование перекрестных связей, но и не достигается необходимая стехиометрия. Это связано с небольшой поверхностной концентрацией STIM1, даже в предположении, что все белки STIM1 находятся на мембране ЭПР, хотя они представлены как на ПМ, так и на ЭПР.

Есть несколько способов интерпретации полученных данных. Во-первых, можно предположить, что прямое взаимодействие не играет значительной роли в тромбоцитах. Поскольку известно, что STIM1 и ORAI1 влияют на функцию тромбоцитов, мы рассмотрим другой механизм SOCE. Известно, что опосредованный путь через iPLA2 присутствует в тромбоцитах и может быть ответственным за SOCE вместо механизма прямого взаимодействия. Однако Harper et. al. [25] было показано, что активации iPLA2 недостаточно для запуска депоуправляемого входа кальция в тромбоцитах. Таким образом, вопрос о том, что опосредованный путь является основным, остается открытым.

Другой возможный механизм SOCE все еще учитывает прямое взаимодействие STIM1 и ORAI1, но с добавлением каналов TRPC [26], [27]. Известно, что TRPC1 играет роль в SOCE, а также может быть активирован путем связывания с STIM1. Кроме того, есть доказательства того, что каналы TRP имеют тенденцию к колокализации с порами ORAI. Таким образом, комплекс ORAI1-TRPC может по-разному реагировать на активацию STIM1 и не требует такой стехиометрии, как одиночная пора ORAI1.

Вклад авторов

разработка концепции, А. К. Г.Д.; методология, А. К. Г.Д.; программная реализация, А.К.Г.Д.; валидация, А.К.Г.Д.; написание текста, А.К.Г.Д.; визуализация, А.К.Г.Д.; Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Автор заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа была выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда 21-74-20087.

Список литературы

1. S. P. Jackson, 'The growing complexity of platelet aggregation', *Blood*, vol. 109, no. 12, pp. 5087–5095, Jun. 2007, doi: 10.1182/blood-2006-12-027698.
2. D. Varga-Szabo, A. Braun, and B. Nieswandt, 'Calcium signaling in platelets', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, no. 7, pp. 1057–1066, Jul. 2009, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
3. C. W. Taylor and P. Thorn, 'Calcium signalling: IP3 rises again... and again', *Current Biology*, vol. 11, no. 9, pp. R352–R355, May 2001, doi: 10.1016/S0960-9822(01)00192-0.
4. E. S. Piedras-Rentería, C. F. Barrett, Y.-Q. Cao,

- and R. W. Tsien, 'Voltage-gated calcium channels, calcium signaling, and channelopathies', in *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 41, Elsevier, 2007, pp. 127–166. doi: 10.1016/S0167-7306(06)41005-X.
5. J. Liou et al., 'STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx', *Current Biology*, vol. 15, no. 13, pp. 1235–1241, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.cub.2005.05.055.
 6. M. Fahrner, I. Derler, I. Jardin, and C. Romanin, 'The STIM1/Orai signaling machinery', *Channels*, vol. 7, no. 5, pp. 330–343, Sep. 2013, doi: 10.4161/chan.26742.
 7. K. Gilio et al., 'Roles of Platelet STIM1 and Orai1 in Glycoprotein VI- and Thrombin-dependent Procoagulant Activity and Thrombus Formation', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 31, pp. 23629–23638, Jul. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.108696.
 8. A. Berna-Erro, I. Jardín, T. Smani, and J. A. Rosado, 'Regulation of Platelet Function by Orai, STIM and TRP', in *Calcium Entry Pathways in Non-excitable Cells*, vol. 898, J. A. Rosado, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 157–181. doi: 10.1007/978-3-319-26974-0_8.
 9. R. Hooper, E. Samakai, J. Kedra, and J. Soboloff, 'Multifaceted roles of STIM proteins', *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, vol. 465, no. 10, pp. 1383–1396, Oct. 2013, doi: 10.1007/s00424-013-1270-8.
 10. S. Berlansky, C. Humer, M. Sallinger, and I. Frischauf, 'More Than Just Simple Interaction between STIM and Orai Proteins: CRAC Channel Function Enabled by a Network of Interactions with Regulatory Proteins', *IJMS*, vol. 22, no. 1, p. 471, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22010471.
 11. E. D. Covington, M. M. Wu, and R. S. Lewis, 'Essential Role for the CRAC Activation Domain in Store-dependent Oligomerization of STIM1', *MBoC*, vol. 21, no. 11, pp. 1897–1907, Jun. 2010, doi: 10.1091/mbc.e10-02-0145.
 12. C. Y. Park et al., 'STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1', *Cell*, vol. 136, no. 5, pp. 876–890, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.014.
 13. M. M. Wu, E. D. Covington, and R. S. Lewis, 'Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions', *MBoC*, vol. 25, no. 22, pp. 3672–3685, Nov. 2014, doi: 10.1091/mbc.e14-06-1107.
 14. T. Gwozdz, J. Dutko-Gwozdz, V. Zarayskiy, K. Peter, and V. M. Bolotina, 'How strict is the correlation between STIM1 and Orai1 expression, puncta formation, and I CRAC activation?', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 295, no. 5, pp. C1133–C1140, Nov. 2008, doi: 10.1152/ajpcell.00306.2008.
 15. M. Yen and R. S. Lewis, 'Numbers count: How STIM and Orai stoichiometry affect store-operated calcium entry', *Cell Calcium*, vol. 79, pp. 35–43, May 2019, doi: 10.1016/j.ceca.2019.02.002.
 16. V. M. Bolotina, 'Orai, STIM1 and iPLA 2 β : a view from a different perspective: Orai, STIM1 and iPLA 2 β ', *The Journal of Physiology*, vol. 586, no. 13, pp. 3035–3042, Jul. 2008, doi: 10.1113/jphysiol.2008.154997.
 17. P. Csutora et al., 'Novel Role for STIM1 as a Trigger for Calcium Influx Factor Production', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 21, pp. 14524–14531, May 2008, doi: 10.1074/jbc.M709575200.
 18. A. N. Sveshnikova et al., 'Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling', *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 10, pp. 2045–2057, Oct. 2016, doi: 10.1111/jth.13442.
 19. A. T. Dolan and S. L. Diamond, 'Systems Modeling of Ca²⁺ Homeostasis and Mobilization in Platelets Mediated by IP₃ and Store-Operated Ca²⁺ Entry', *Biophysical Journal*, vol. 106, no. 9, pp. 2049–2060, May 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.028.
 20. B. Schmidt, D. Alansary, I. Bogeski, B. A. Niemeyer, and H. Rieger, 'Reaction-diffusion model for STIM-ORAI interaction: The role of ROS and mutations', *Journal of Theoretical Biology*, vol. 470, pp. 64–75, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.jtbi.2019.02.010.
 21. L. B. Kier, C.-K. Cheng, and J. D. Nelson, 'Models of Solute Aggregation Using Cellular Automata', *Chemistry & Biodiversity*, vol. 6, no. 3, pp. 396–401, 2009, doi: 10.1002/cbdv.200800285.
 22. T. A. Waigh, *Applied Biophysics*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. doi: 10.1002/9780470513156.
 23. M. Muik et al., 'Dynamic Coupling of the Putative Coiled-coil Domain of ORAI1 with STIM1 Mediates ORAI1 Channel Activation', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 12, pp. 8014–8022, Mar. 2008, doi: 10.1074/jbc.M708898200.
 24. Y. Zhou et al., 'Cross-linking of Orai1 channels by STIM proteins', *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 115, no. 15, pp. E3398–E3407, Apr. 2018, doi: 10.1073/pnas.1720810115.
 25. M. T. Harper and S. O. Sage, 'Is calcium-independent phospholipase A 2 required for store-operated calcium entry in human platelets?', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 6, no. 10, pp. 1819–1821, Oct. 2008, doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03113.x.
 26. C. Galán, H. Zbidi, A. Bartegi, G. M. Salido, and J. A. Rosado, 'STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 490, no. 2, pp. 137–144, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.abb.2009.08.007.
 27. J. J. Lopez, I. Jardin, J. Sanchez-Collado, G. M. Salido, T. Smani, and J. A. Rosado, 'TRPC Channels in the SOCE Scenario', *Cells*, vol. 9, no. 1, p. 126, Jan. 2020, doi: 10.3390/cells9010126.

Существует значимая корреляция между гиперактивацией тромбоцитов и их потреблением при COVID-19. Пилотное исследование на пациентах из больницы ЦКБ РАН (г. Троицк)

М.Г. Степанян^{1,2,3}, А.А. Мартыянов^{1,2,4}, О.И. Ан^{1,5}, А.Е. Болдова¹, С.А. Румянцев⁶, А.Г. Румянцев², М.А. Пантелеев¹⁻³, Ф.И. Атауллаханов¹⁻³ и А.Н. Свешникова^{1-3,5#}

1. Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
2. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия
3. Физический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
4. Институт Биохимической Физики РАН (ИБХФ РАН) им. Н.М. Эммануэля, Москва, Россия
5. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
6. Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения Больница Российской академии наук (г. Троицк), Троицк, Москва, Россия

Автор для переписки: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Аннотация

Известно, что при COVID-19 избыточная свёртываемость крови и, иногда, тромбоцитопения, могут быть характерными для тяжёлого течения заболевания. При этом роль тромбоцитов в патогенезе COVID-19 весьма противоречива. В рамках настоящего исследования нашей задачей было определение степени гиперактивации тромбоцитов пациентов с COVID-19. В исследовании была использована проточная цитометрия цельной крови, окрашенной аннексином-V и лактадгерином («PS + тромбоциты»). Также была разработана стохастическая математическая модель производства и потребления тромбоцитов. Экспериментально было показано, что процент PS + тромбоцитов у пациентов с COVID-19 был в два раза выше, чем у здоровых доноров. При этом была получена статистически значимая корреляция между количеством PS+ тромбоцитов и процентом повреждения легких у пациентов. Не было обнаружено никакой связи между гибелью тромбоцитов и терапией пациентов в стационарах. Доля PS+ тромбоцитов была повышена только у пациентов с хроническими заболеваниями лёгких. Хотя у пациентов не наблюдалось выраженных тромбоцитопений, наблюдаемое увеличение размера тромбоцитов (параметр FSC-A в проточной цитометрии) может указывать на то, что возраст тромбоцитов у пациентов был снижен. Разработанная компьютерная модель производства-утилизации тромбоцитов подтверждает возможность

интенсивного потребления тромбоцитов без значимых изменений их количества. Таким образом, можно заключить, что наблюдаемая гиперактивация тромбоцитов при COVID-19 может быть вызвана активацией тромбоцитов в кровотоке, что приводит к их потреблению, но не вызывает значительную тромбоцитопению.

Ключевые слова: COVID-19, тромбоциты, свёртывание крови, воспаление, гиперактивация

Введение

Вирус SARS-CoV-2 стал причиной пандемии, разразившейся во всем мире в 2020 году [1]. У пациентов с тяжелой формой заболевания последовательно развиваются интерстициальная пневмония, тромбозы и легочная недостаточность [2], [3]. Также у пациентов с COVID-19 часто встречается тромбоцитопения, часто коррелирующая с тяжестью заболевания и более высокими показателями смертности [4] - [6]. Известно, что COVID-19 вызывает сильную воспалительную реакцию – цитокиновый шторм, характеризующийся, среди прочего, повышенными концентрациями интерлейкинов 1 β , 6 и 8 [7]. Это воспалительное состояние является одной из причин серьезных нарушений гемостаза, наблюдаемых у пациентов с тяжелыми формами заболевания [8]. Тромбоэмболия легочной артерии и тромбоз глубоких вен нижних конечностей являются одними из ведущих причин смертности от COVID-19 [9]. В менее тяжелых случаях микротромбы все еще

присутствовали в легких пациентов [10], [11].

Тромбоз при COVID-19, предположительно, инициируется макрофагами – клетками, ответственными за воспалительный ответ в легких [12], [13]. Макрофаги и эпителиальные клетки легких активируются в результате контакта с вирусом SARS-CoV-2, что усиливает вызывают воспалительную реакцию и привлечение новых макрофагов. Это приводит к активации эндотелиоцитов кровеносных сосудов [13], [14]. Активированные эндотелиальные клетки выставляют на своей поверхности мощный активатор каскада плазменной коагуляции – тканевый фактор (TF) [15]. Активированные эндотелиоциты также секретируют фактор фон Виллебранда (vWF), который привлекает тромбоциты к воспаленному эндотелию [16]. Таким образом, вызванная COVID-19 активация эндотелиальных клеток активирует и тромбоцитарное, и плазменное звено гемостаза, что приводит к патологическому тромбозу [12]. Косвенным доказательством роли свертывания крови в патологии COVID-19 является эффективность антикоагулянтной терапии гепарином и его производными [17]. Помимо эффективности в ингибировании свертывания крови, гепарины также известны своим противовоспалительным действием [8], [18]. В то время как эффективность гепарина при терапии COVID-19 была многократно продемонстрирована [19], [20], эффективность антитромбоцитарных препаратов по-прежнему остается спорной [21].

Ключевой фермент плазменного каскада свертывания крови, тромбин, может также вызывать гиперактивацию тромбоцитов, что запускает их прокоагулянтный ответ [22]. Прокоагулянтные тромбоциты характеризуются присутствием фосфатидилсерина (PS) на их поверхности, что, в свою очередь, ускоряет процесс свертывания плазмы крови [22], [23]. PS-положительные (PS+) тромбоциты, предположительно, являются одним из маркеров повышенной активации тромбоцитов при кровообращении [24] - [26]. Следует отметить, что эта популяция тромбоцитов быстро выводится из кровотока макрофагами печени [27]. Таким образом, при стабильной гиперактивации тромбоцитов и их переходе в прокоагулянтное состояние, средний возраст всех тромбоцитов в кровотоке будет снижаться. Примечательно, что более молодые тромбоциты, недавно произведенные мегакариоцитами в костном мозге, имеют больший размер [24] и более склонны к активации, нежели старые тромбоциты [28], которые утилизируются в печени или селезенке после 7-10 дней в кровотоке [25]. Таким образом, средний размер тромбоцитов, а также процентное содержание PS+ тромбоцитов

могут быть индикаторами активации и клиренса тромбоцитов в кровотоке.

Механизмы влияния SARS-CoV-2 на функционирование тромбоцитов и роль гемостаза тромбоцитов в патологии COVID-19 в целом в настоящее время активно изучаются. Younes et al. показали, что вирусная РНК присутствовала в тромбоцитах как тяжелых, так и не тяжелых пациентов в 22% случаев [29]. Напротив, Manne et al. показали, что вирусная РНК не была обнаружена у пациентов с COVID-19 (3 из ОПИТ и один не из ОПИТ) с помощью просвечивающей электронной микроскопии, в то время как экспрессия мРНК гена SARS-CoV-2 N1 присутствовала у 2 из 25 пациентов. Оба они находились в ОПИТ [3]. Рецептор к ангиотензин-конвертирующему ферменту 2 (ACE-2) [8] является ключевым путем проникновения SARS-CoV-2 в клетки человека. Однако неясно, присутствует ли этот рецептор на тромбоцитах [3], [6], [29], [30]: есть работы, подтверждающие [29], [31] и отрицающие [3] это. Наконец, покоящиеся тромбоциты пациентов с COVID-19 были увеличены в размере [28] и имели повышенную экспрессию P-селектина [3], [32]. Следует отметить, что у пациентов с COVID-19 было зарегистрировано повышение уровня тромбопоэтина - основного индуктора тромбопоэза тромбоцитов [32]. Следовательно, наблюдаемое увеличение размера тромбоцитов может быть связано с увеличением тромбопоэтин-зависимой продукции новых (более молодых) клеток [29].

Подводя итог, тромбоциты пациентов с COVID-19 являются дефектными и причина этого не ясна до конца. В настоящей работе, основываясь на экспериментальных наблюдениях за некрозом и размером тромбоцитов, а также на компьютерном моделировании, мы предполагаем, что наблюдаемые изменения тромбоцитов пациентов с COVID-19 могут быть объяснены их повышенной активацией в кровотоке.

Материалы и Методы

Пациенты

32 пациента с диагнозом Коронавирусная инфекция, находившиеся на лечении в ФГБУ «Больница Российской академии наук» (г. Троицк), а также 5 здоровых доноров в возрасте от 21 до 45 лет, которые не болели и не принимали никаких лекарств в течение последнего месяца, участвовали в исследовании. Состояние всех пациентов было охарактеризовано врачами как «легкая степень тяжести» и не требовало искусственной вентиляции легких. Все процедуры соответствуют этическим стандартам Национального комитета по этике

исследований и Хельсинкской декларации 1964 года с последующими поправками. Информированное добровольное согласие было получено от каждого из участников, включенных в исследование. В дальнейшем все пациенты были выписаны из больницы в течение 2 недель в связи с улучшением их состояния. Образцы крови пяти пациентов анализировали дважды в разные дни. Исследование одобрено решением Независимого этического комитета Национального исследовательского центра имени Дмитрия Рогачева № 3/2020 от 19 мая 2020 года.

Материалы

Фибриноген-Alexa647, AnnexinV-Alexa647, лактадгерин-FITC (Sony Biotechnology, Сан-Хосе, США), HEPES, бычий сывороточный альбумин, D (+) глюкоза (Sigma, США); NaCl; Na₂HPO₄; KCl; NaHCO₃; MgCl₂; CaCl₂ (Агат-Мед, Москва, Россия).

Проточная цитометрия

Кровь пациентов забиралась в пробирки объемом 3 мл, содержащие цитрат натрия (3,8%). Собранная кровь хранилась при комнатной температуре в течение 30 минут, за которые наблюдалось оседание эритроцитов в нижних слоях пробирки крови. Затем образцы отбирались из верхних 10 процентов объема пробирки и разбавлялись в буфере Тирода (134 mM NaCl; 0,34 mM Na₂HPO₄; 2,9 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 20 mM HEPES; 5 mM глюкозы; 1 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂; BSA 2% по весу; pH 7,3) до концентрации тромбоцитов 1 × 10³ на 1 мл. После этого к каждому образцу добавляли AnnexinV-Alexa647 (2% по объёму) и Lactadherin-FITC (2% по объёму). Затем полученные образцы были инкубированы в течение 10 минут, согласно [24]. Полученные пробы анализировались с помощью проточного цитометра Beckman Coulter Navios. Популяции тромбоцитов и везикул идентифицировали по прямому и боковому светорассеянию (рис. 1А). Аннексин-V-, Лактадгерин-, а также Аннексин-V/Лактадгерин- (двойные) положительные события были идентифицированы, в соответствие с рис. 1В. Событие считалось PS-положительным (PS +), если оно было обнаружено в областях lact +, anV + или lact + anV + (см. Рис. 1В).

Компьютерная модель

Компьютерная модель была построена по принципам клеточного автомата [33]: каждая ячейка рассматривается в программе как отдельный объект. В модели присутствовали два типа клеток: **тромбоциты** и **мегакариоциты**. У каждого тромбоцита есть две характеристики: **возраст** и **размер**. Каждый мегакариоцит имеет только одну характеристику: **продукция тромбоцитов** = 3500 (тромбоцитов на мегакариоцит, [34]).

Age – количество дней (шаг модельного времени), в течение которых существует объект. На каждом временном шаге в костном мозге вырабатывается **M** новых мегакариоцитов. **M** - случайное число из **N (μ = 10; σ = 1)**, где **N (;)** - нормальное распределение. Мегакариоцит может производить тромбоциты только один раз. Модель описывает события, относящиеся к 1 мкл крови. На продукцию тромбоцитов также влияет концентрация тромбопоэтина:

$$P = PlateletProduction \times n \times TPO, \quad (1)$$

где **P** - количество тромбоцитов, продуцируемых мегакариоцитами, **n** - случайное значение из **N (μ = 1; σ = 0,1)**, **TPO** - параметр, отражающий концентрацию тромбопоэтина в соответствии с уравнением (2):

$$TPO = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{N_{TPO}}{Plt}\right)^h}, \quad (2)$$

где **N_{TPO}** - приблизительное количество тромбоцитов, ниже которого начинается выработка ТПО в печени, а **Plt** - количество тромбоцитов в данный момент времени, параметры **N_{TPO} = 120000** и **h = 6** были подобраны для описания экспериментальных данных о взаимосвязи между количеством тромбоцитов и концентрацией **[TPO]** в крови из работы Макаг et al. [35]. В организме человека тромбоциты могут выводиться из кровотока в печени и селезенке, и вероятность клиренса тромбоцитов увеличивается с увеличением возраста тромбоцитов [36]. Таким образом, в модели на каждом временном шаге каждый тромбоцит может быть удалён с вероятностью:

$$p_{clear} = n_{nat} + n_{thr}, \quad (3)$$

где **n_{nat}** отражает естественное удаление тромбоцитов и представляет собой случайное значение из **N (0,625 · Age; 0,0125 · Age)**, а **n_{thr}** отражает удаление тромбоцитов из-за их участия в образовании тромба и является случайным значением из **N (0,625 · K; 0,0125 · K)**, где **K** - индекс потребления, который можно варьировать для имитации тяжести тромбоза. Известно, что размер тромбоцитов связан с возрастом тромбоцитов и содержанием РНК [37] - [39]. Чтобы смоделировать распределение размеров тромбоцитов, мы ввели в модель уравнение (3), в котором параметр размера пересчитывается из параметра возраста:

$$size = s_0 \times \left(1 - \frac{(1 - \frac{Min}{Max})}{1 + \left(\frac{Mean}{age}\right)^h}\right), \quad (4)$$

где **s₀** отражает исходный размер тромбоцитов и представляет собой значение из **N (12; 1)** в **[fL]**, параметры **Max = 11 [fL]** и **Min = 6 [fL]** отражают распределение по размеру тромбоцитов, обнаруженное у здоровых доноров [40], **Среднее значение = 3 [дня]** отражает средний возраст тромбоцитов [39]. Формула (3) и коэффициент

$h = 3$ были подобраны для описания данных о взаимосвязи между долей незрелых тромбоцитов, размером тромбоцитов и количеством тромбоцитов [37] - [39]. Модель построена на Python 3.7.

Клинические данные

Результаты общего анализа крови, биохимического анализа, теста на свертываемость крови, компьютерной томографии, данные ежедневных обследований, возраст и диагнозы пациентов любезно предоставлены больницей с согласия пациентов.

Обработка данных

Данные проточной цитометрии были обработаны с использованием программного обеспечения FlowJo™. Статистический анализ проводился посредством GraphPad Prism.

Результаты и обсуждение

У пациентов с COVID-19 увеличен размер тромбоцитов, а также увеличена доля фосфатидилсерин положительных тромбоцитов

У исследованных в настоящей работе пациентов с лёгкой формой COVID-19 не наблюдалось выраженной тромбоцитопении: количество тромбоцитов находилось в пределах $139 \times 10^3 - 519 \times 10^3$ тромбоцитов/мкл. Для измерения размера и гиперактивации тромбоцитов, было проведено исследование посредством проточной цитометрии тромбоцитов пациентов, окрашенных лактадгерином и аннексином V (рис. 1). Анализ прямого рассеяния тромбоцитов (FS-A) выявил значительное увеличение FS-A у пациентов по сравнению со здоровыми донорами (среднее значение \pm SD: $213 \pm 25 \times 10^3$ абс. ед. для

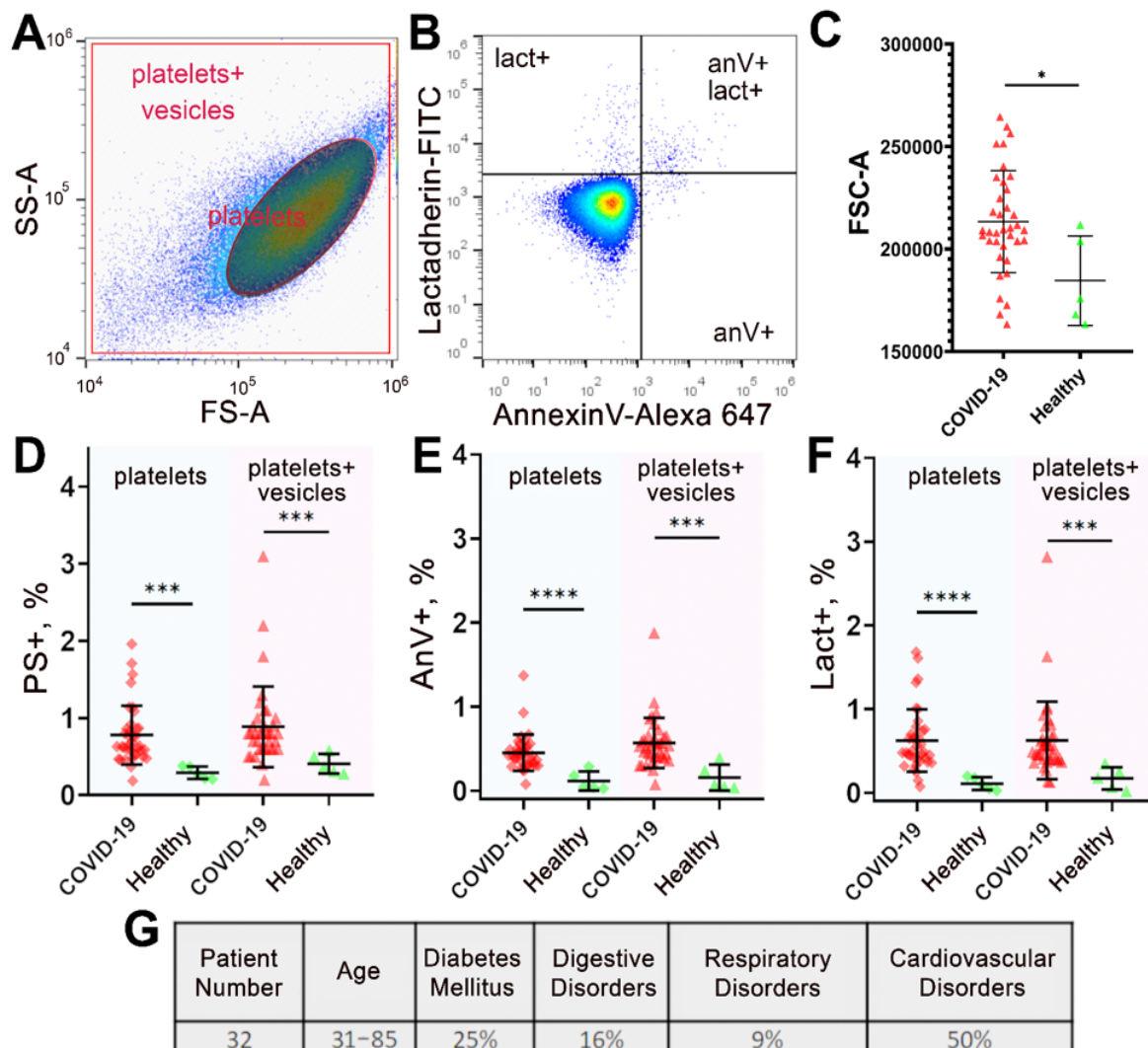


Рисунок 1. Сравнение процента прокоагулянтных тромбоцитов и их размера у пациентов с COVID-19 и здоровых доноров. А - Выделение области для прямого (FS-A) и бокового (SS-A) рассеяния света: события в красном овале соответствуют тромбоцитам, события в красном квадрате соответствуют тромбоцитам и везикулам. В - Определение доли событий, положительных для аннексина (anV +), лактадгерина (lact +) и фосфатидилсерин-положительных событий (попадающих в обе или одну из областей). С - Сравнение полученных средних размеров тромбоцитов от здоровых доноров (зеленый) и пациентов с Covid-19 (красный). D - Сравнение полученных значений процента фосфатидилсерин-положительных событий у здоровых доноров (зеленый) и пациентов с Covid-19 (красный). E - Сравнение полученных значений процента аннексин-положительных событий у здоровых доноров (зеленый) и пациентов с COVID-19 (красный). F - Сравнение полученных значений процента лактадгерин-положительных событий у здоровых доноров (зеленый) и пациентов с COVID-19 (красный). G - Общая информация о пациентах с COVID-19, включенных в исследование. Для определения значимости использовался критерий Манна-Уитни; три звездочки означают $p < 0,001$, четыре - $p < 0,0001$.

пациентов, $185 \pm 20 \times 10^3$ абс. ед. для здоровых доноров, $p = 0,027$, рис. 1B). Полученные результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными [3], [32]. Интересно, что Ковач и др. сообщили, что увеличение размера тромбоцитов характерно для пациентов, страдающих венозной тромбоэмболией [41], что позволяет нам подозревать, что в нашей когорте пациентов с COVID-19 также могут наблюдаться тромботические осложнения [42]. Маловероятно, что наблюдаемое увеличение размера тромбоцитов является характерным строго для пациентов, поражённых вирусом SARS-COV-2. Несколько недавних исследований показали, что количество тромбоцитов значительно снижается, а их размер увеличивается при пневмонии, вызванной гриппом [43], [44]. Тяжелая тромбоцитопения крайне редко встречается у заражённых вирусом Эпштейна-Барра, но эта инфекция часто проявляется умеренным снижением количества тромбоцитов, а также умеренным увеличением размера тромбоцитов в лёгких случаях [45].

Процент PS + тромбоцитов у пациентов был более чем в два раза выше, чем у здоровых доноров (среднее значение \pm SD: $0,74 \pm 0,37\%$ для пациентов, $0,29 \pm 0,07\%$ для здоровых доноров; $p < 0,0001$, рис. 1D-F). Средний процент PS+ событий был выше для лактадгерина, чем для аннексина V ($p = 0,0372$, рис. 1E, F), что согласуется с литературными данными о

более высокой чувствительности лактадгерина для идентификации фосфатидилсерина на поверхности клеток [46]. Значения, полученные для обоих маркеров PS+ тромбоцитов, хорошо коррелировали друг с другом ($r = 0,64$, $p < 0,0001$), равно как и общий процент PS+ событий ($r = 0,74$, $p < 0,0001$ для аннексина V, $r = 0,96$, $p < 0,0001$ для лактадгерина, см. Таблицу 1). Таким образом, можно сделать вывод, что мы наблюдаем гиперактивацию тромбоцитов при COVID-19, что соответствует ранее опубликованным данным [32].

Известно, что PS+ тромбоциты образуются в ответ на сильную стимуляцию, например, комбинацией коллагена и тромбина [47], [48]. Наблюдаемое увеличение процента PS + тромбоцитов (0,5–1,5%) у пациентов с Covid-19 может отражать постоянную активацию тромбоцитов в кровообращении [49]. Воспалительный процесс в организме пациента с COVID-19 неразрывно связан с активацией клеток в соседних тканях [12] и может приводить к активации тромбоцитов из-за их контакта с продуктами тромбообразующих процессов (например, с содержимым тромбоцитов: гранулами, тромбином, АДФ и др.) [3]. Таким образом, в случае продолжающегося умеренного микротромбоза легких может наблюдаться слабое увеличение количества PS + тромбоцитов. Это соответствует клинической картине исследуемых пациентов, поскольку ни у одного из них не было тяжелых тромботических осложнений в ходе исследования.

Корреляция параметров тромбоцитов с клинической картиной

Тромбоциты являются не только важными участниками свертывания крови, но также являются важным источником медиаторов воспаления. Помимо антикоагулянтной терапии, применяемой для терапии пациентов с COVID-19, противовоспалительная терапия также проводится с использованием различных подходов: к ним относятся иммунодепрессанты (например, актепра, тоцилизумаб), противомаларийные препараты (гидроксихлорохин) и кортикостероиды. [7]. Поэтому нами была проанализирована корреляция между параметрами тромбоцитов, применяемой терапией и сопутствующими заболеваниями пациентов.

Доля PS + тромбоцитов коррелировала ($r = 0,69$, $p < 0,01$) с повреждением легких (по данным компьютерной томографии, выполненной не позднее, чем через 2 дня от даты исследования тромбоцитов, таблица 1). Эти результаты хорошо согласуются с гипотезой о влиянии воспалительного процесса, происходящего в

	AnV+	Lact+	PS+	Age	Lung Damage	Resp. Rate
Annexin+		0.64	0.74	-0.07	0.42	0.15
Lactadherin+	0.64		0.96	-0.43	0.71	0.22
PS+	0.74	0.96		-0.34	0.69	0.10
Platelets	-0.53	-0.47	-0.49	0.02	-0.50	-0.36
Platelet Forward Scattering	0.41	0.33	0.35	-0.15	0.48	0.27
	CRP	AST/ALT	Bilirubin	Glucose	Total protein	Hemoglobin
Annexin+	0.10	-0.08	-0.10	-0.12	-0.76	0.32
Lactadherin+	0.13	-0.11	-0.24	-0.10	-0.56	0.21
PS+	0.07	-0.11	-0.26	-0.14	-0.51	0.24
Platelets	-0.19	-0.17	-0.03	0.02	0.90	0.26
Platelet Forward Scattering	0.20	-0.51	0.00	-0.04	-0.79	0.31
	Platelets	Platelet Forward Scattering	Leukocytes	INR	Fibrinogen	D-dimer
Annexin+	-0.53	0.41	-0.22	0.06	-0.61	0.22
Lactadherin+	-0.47	0.33	-0.16	-0.13	-0.42	0.23
PS+	-0.49	0.35	-0.18	-0.09	-0.50	0.17
Platelets		-0.29	0.22	-0.14	0.63	-0.29
Platelet Forward Scattering	-0.29		0.14	-0.13	-0.19	0.17

Таблица 1. Коэффициенты корреляции Пирсона (R) для процента фосфатидилсерин-положительных (PS +) событий, количества тромбоцитов и прямого рассеяния тромбоцитов с показателями состояния пациента и значениями клинических тестов: возраст, процент повреждения легких (по КТ), ЧДД, С-реактивный белок (CRP), АСТ/АЛТ, общий билирубин, глюкоза, общий белок, гемоглобин, тромбоциты, размер тромбоцитов, лейкоциты, МНО, фибриноген, D-димер. Зеленые значения указывают на значение $p < 0,05$.

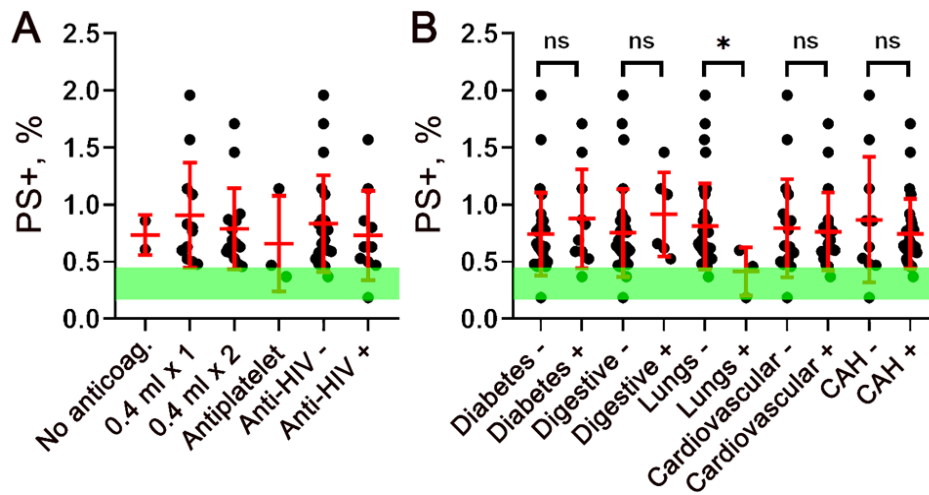


Рисунок 2. Связь положительных по фосфатидилсерину событий с клиническими параметрами пациентов, наличием хронических заболеваний и проводимой терапией. АА - Сравнение результатов пациентов на терапии, которую они принимают (3 разные группы по количеству низкомолекулярных гепаринов; группа, принимавшая антикоагулянты и антиагреганты; группа, принимавшая препараты против ВИЧ, и не принимавшая их). При использовании статистики критерия Манна-Уитни достоверных различий между группами не обнаружено. В - Сравнение процента фосфатидилсерин-положительных событий для групп пациентов, страдающих различными хроническими заболеваниями (сахарный диабет II типа (Diabetes), заболевания желудочно-кишечного тракта (Digestive), легких (Lungs), сердечно-сосудистые (Cardiovascular), хроническая артериальная гипертензия (CAH)). Зеленый прямоугольник показывает нормальный диапазон, полученный для здоровых доноров (среднее \pm 2 стандартных отклонения). Для определения значимости использовался критерий Манна-Уитни; одна звездочка означает $p < 0,05$. $p < 0.05$.

легких, на систему свертывания, поскольку увеличение площади пораженных альвеол приводит к активации соседних эндотелиальных тканей [50], [51]. Кроме того, наблюдалась отрицательная корреляция ($r = -0,49$, $p < 0,05$) между общим количеством тромбоцитов и долей прокоагулянтных клеток. Мы предполагаем, что причиной этих изменений может быть высокое потребление тромбоцитов (таблица 1). Процент

PS + тромбоцитов и количество тромбоцитов коррелировали с уровнем фибриногена в крови ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно, таблица 1). Этот результат можно объяснить тромбообразованием, приводящим к повышенному потреблению факторов свертывания крови и тромбоцитов. Благодаря этому печень компенсирует потребление белка [28], [52]. Не было обнаружено корреляции между долей прокоагулянтных

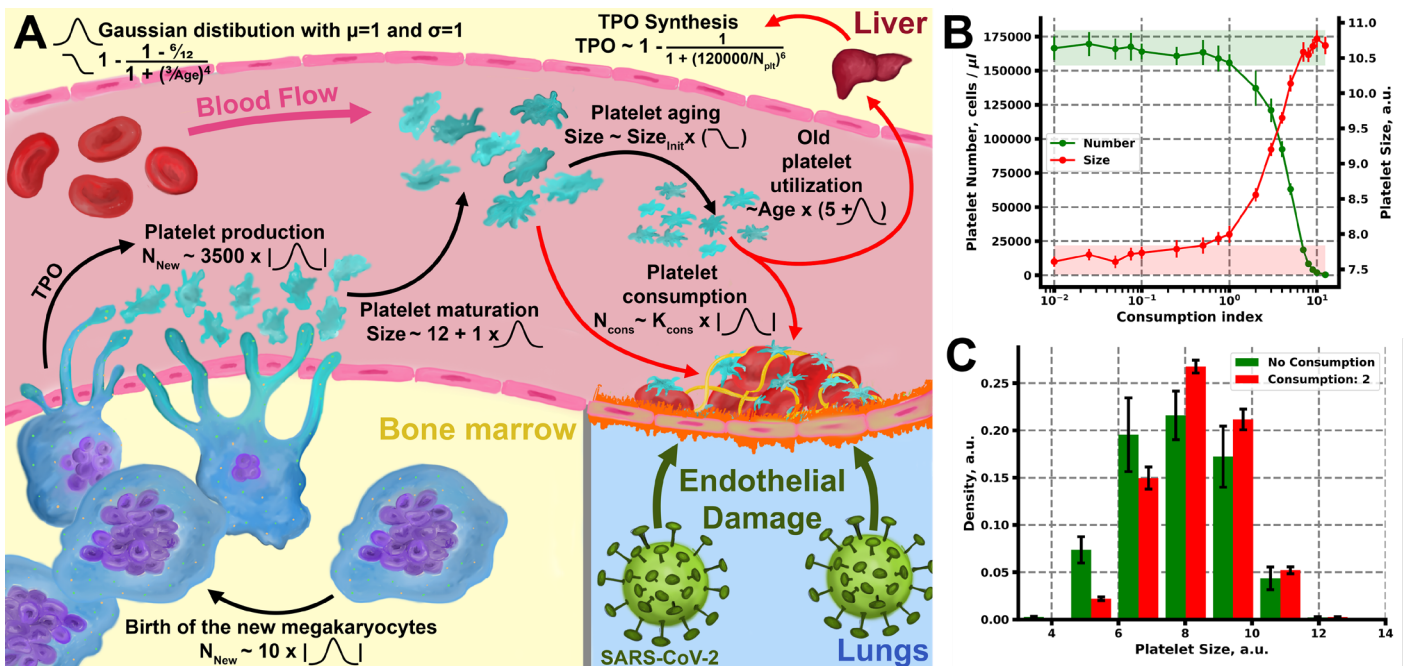


Рисунок 3. Компьютерная модель производства и потребления тромбоцитов при тромбозе, вызванном COVID-19. А - Подробная схема модели (наиболее чувствительные реакции выделены красным). В - Зависимость среднего количества тромбоцитов (зеленая кривая и точки) и размера тромбоцитов (красная кривая и точки) от индекса потребления тромбоцитов в модели. Количество и размер тромбоцитов при отсутствии потребления находятся в областях, выделенных зеленым и красным прямоугольниками соответственно. С - Распределение тромбоцитов по размеру при отсутствии (зеленые столбцы) и наличии (красные столбцы) потребления (с индексом потребления, установленным на 2). Усы на всех графиках представляют SD.

тромбоцитов и С-реактивным белком или D-димером (см. Таблицу 1).

Корреляция параметров тромбоцитов и применяемой терапии

Каждому из включённых в исследование пациентов назначалась тромбопрофилактика [53]. Известно, что использование гепаринов может привести к транзиторной гепарин-индуцированной тромбоцитопении (ГИТ) [54], [55]. Однако в нашем исследовании этого не наблюдалось. Количество PS + тромбоцитов у пациентов, получавших гепарин, также не отличалось по сравнению с другими пациентами с COVID-19 (рис. 2А). Иногда пациентам с COVID-19 также назначают антиагрегантные препараты [56]. У двух из трех пациентов, получавших антитромбоцитарные препараты до госпитализации в связи с коронавирусной инфекцией, количество PS + тромбоцитов было значительно ниже, чем у других пациентов с COVID-19 (рис. 2А).

Согласно ранее опубликованным рекомендациям, пациентам в больнице назначают другие терапевтические средства, в том числе антиретровирусный препарат лопинавир [57], [58]. Различий в количестве прокоагулянтных тромбоцитов между группами пациентов, которые принимали и не принимали комбинацию лопинавир-ритонавир не было обнаружено (рис. 2А).

При сравнении групп пациентов на наличие хронических заболеваний статистически значимые различия ($p = 0,027$) выявлены только для группы пациентов с хроническими заболеваниями легких. Процент событий PS + при наличии заболевания был ниже, чем при отсутствии (среднее значение \pm стандартное отклонение: $0,81 \pm 0,37\%$ для отсутствия, $0,41 \pm 0,17\%$ для присутствия, рис. 2В), что может быть связано с наличием компенсаторный механизм в системе свертывания крови этих пациентов. Когорта пациентов, включенных в это исследование, весьма неоднородна с точки зрения возраста и состояния здоровья. Однако отсутствие значимых различий между разными группами пациентов (рис. 2В, рис. S1) и отсутствие наблюдаемого измененного фенотипа тромбоцитов при хронических заболеваниях [59] - [62] позволяет нам утверждать, что данный фенотип сформировался именно по причине COVID-19.

Компьютерная модель предсказывает, что в основе тромбоцитопатии COVID-19 лежит усиленное потребление тромбоцитов

Фенотип тромбоцитов у пациентов с COVID-19

оказался достаточно характерным: в то время как ни в литературе, ни в нашем исследовании не было обнаружено значительной тромбоцитопении [3], [28], [29], [32], наблюдалось одновременное увеличение размера тромбоцитов и доли PS + тромбоцитов. Чтобы понять, может ли такой фенотип быть вызван потреблением тромбоцитов из-за тромбоза, мы построили модель продукции, старения и клиренса тромбоцитов (рис. 3А).

В модели, в отсутствие дополнительного потребления тромбоцитов, среднее количество тромбоцитов составило от 155×10^3 тромбоцитов / мкл до 177×10^3 тромбоцитов / мкл (рис. 3В). Количество тромбоцитов и размер тромбоцитов стохастически колебались (рис. S2 А и В, соответственно). Введение дополнительного потребления, не влиявшего значительно на количество тромбоцитов ($\Delta Plt < 25\ 000$ / мкл), привело к значительному увеличению размера тромбоцитов (рис. 3В, С; S2А, В). Повышенное потребление также привело к «омоложению» тромбоцитов (рис. S2С, D). Увеличение потребления тромбоцитов выше 2 привело к легкой тромбоцитопении и ещё более выраженному снижению среднего возраста тромбоцитов (рис. 3В). Тяжелая тромбоцитопения появлялась при потреблении тромбоцитов выше $K = 5$, что соответствовало потреблению более половины произведенных тромбоцитов (рис. 3В, S2). Дополнительный анализ чувствительности показал, что результаты модели были наиболее чувствительны к параметрам синтеза ТПО, потребления тромбоцитов и клиренса тромбоцитов. Эти реакции выделены красным цветом (рис. 3А).

Примечательно, что доля PS+ тромбоцитов слабо коррелировала со средними значениями FS-A (таблица 1). Этот вывод подтверждает гипотезу о том, что при COVID-19 тромбоциты потребляются из-за тромбоза, что приводит к увеличению фракции PS+ тромбоцитов, снижению среднего возраста тромбоцитов и, следовательно, увеличению их размера. Слабость корреляции может быть вызвана повышенным клиренсом PS+ тромбоцитов печенью и селезенкой [36]. Однако следует также иметь в виду, что клетки во время эксперимента находились в состоянии покоя, и сравнение степени активации для пациентов и здоровых доноров не проводилось.

Заключение

В рамках данной работы мы наблюдали значительное увеличение доли PS+ тромбоцитов у пациентов с COVID-19 (рис. 1). Это явление не коррелирует ни с терапевтическими вмешательствами, проводимыми в стационаре, ни

с хроническими заболеваниями пациентов (рис. 2). Поэтому мы предполагаем, что наблюдаемое увеличение размера тромбоцитов и экспозиция фосфатидилсерина, в основном, вызваны COVID-19 и связанной с ним пневмонией. Ранее сообщалось, что такие изменения могут быть вызваны активным тромбозом [26], [41]. Предлагаемая вычислительная модель демонстрирует, что умеренное потребление, которое не приводит к выраженной тромбоцитопении, может привести к увеличению среднего объема тромбоцитов в 1,3 раза, наблюдаемому у пациентов с COVID-19 (рис. 1).

Основываясь на наших экспериментальных результатах и теоретических выводах, мы предлагаем следующую схему воздействия COVID-19 на тромбоциты человека:

- SARS-CoV-2 вызывает повреждение легких. Это приводит к активации эндотелия кровеносных сосудов и выставлению тканевого фактора (ТФ) в кровотоке [12], [13];
- ТФ вызывает тромбообразование и потребление тромбоцитов;
- Доля PS+ тромбоцитов увеличивается (рис. 1) в результате сильной активации тромбоцитов, а продукция тромбоцитов увеличивается за счет мегакариоцитов (рис. 3) [3], [29], [32] из-за увеличения синтеза ТПО печенью [3];
- Происходит легкое снижение количества тромбоцитов [3], [52], в то время как размер тромбоцитов значительно увеличивается [3], [28].

Таким образом, можно предположить, что терапевтическая коррекция протромбогенного состояния эндотелия сосудов легких может улучшить качество тромбоцитов. Тем не менее, необходимо дальнейшее изучение тромбоцитов и их роли в развитии COVID-19, поскольку тромбоциты потенциально можно использовать для мониторинга системы гемостаза у пациентов с COVID-19.

Вклад авторов

М.Г.С. проводила эксперименты, обрабатывала клинические и экспериментальные данные и писала текст статьи, А.А.М. разрабатывал модель, обрабатывал данные моделирования, проводил эксперименты и редактировал текст статьи, О.И.А. обрабатывала клинические данные, А.Е.Б. обрабатывала экспериментальные данные, С.А.Р. и А.Г.Р. планировали проект и обрабатывали клинические данные, М.А.П. и Ф.И.А. планировали и курировали проект, А.Н.С.

планировала и курировала проект, обрабатывала данные, разрабатывала модель и писала текст статьи. Все авторы предоставляли критическую оценку и помогли сформировать исследование, анализ и рукопись.

Финансирование

Работа была поддержана Стипендией Президента СП-2675.2019.4; грантом эндаунмент фонда “Наука - детям” и Школой Цифровой Медицины Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Список литературы

1. Q. Li et al., ‘Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia’, *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 13, pp. 1199–1207, Jan. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
2. C. Huang et al., ‘Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China’, *The Lancet*, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
3. B. K. Manne et al., ‘Platelet gene expression and function in patients with COVID-19’, *Blood*, vol. 136, no. 11, pp. 1317–1329, Sep. 2020, doi: 10.1182/blood.2020007214.
4. X. Yang et al., ‘Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 18, no. 6, pp. 1469–1472, 2020, doi: <https://doi.org/10.1111/jth.14848>.
5. G. Lippi, M. Plebani, and B. M. Henry, ‘Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis’, *Clinica Chimica Acta*, vol. 506, pp. 145–148, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022.
6. O. I. An et al., ‘Platelets in COVID-19: “innocent bystanders” or active participants?’, *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*, vol. 20, no. 1, pp. 184–191, Apr. 2021, doi: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-184-191.
7. Q. Ye, B. Wang, and J. Mao, ‘The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19.’, *The Journal of Infection*, vol. 80, no. 6, pp. 607–613, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.037.
8. E. Terpos et al., ‘Hematological findings and complications of COVID-19’, *American Journal of Hematology*, vol. 95, no. 7, pp. 834–847, Jul. 2020, doi: 10.1002/ajh.25829.
9. M. Panigada et al., ‘Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis.’, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, vol. 18, no. 7, pp. 1738–1742, Jul. 2020, doi: 10.1111/jth.14850.
10. N. Tang, H. Bai, X. Chen, J. Gong, D. Li, and Z. Sun, ‘Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 18, no. 5, pp. 1094–1099, May 2020, doi: 10.1111/jth.14817.

11. F. A. Klok et al., 'Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19', *Thrombosis research*, vol. 191, pp. 145–147, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.013.
12. M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Rénia, P. A. MacAry, and L. F. P. Ng, 'The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention', *Nature Reviews Immunology*, vol. 20, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
13. R. Alon et al., 'Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19', *Nature Reviews Immunology*, pp. 1–16, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-00470-2.
14. Bonaventura et al., 'Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19', *Nat Rev Immunol*, vol. 21, no. 5, Art. no. 5, May 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.
15. M. Witkowski, U. Landmesser, and U. Rauch, 'Tissue factor as a link between inflammation and coagulation.', *Trends in cardiovascular medicine*, vol. 26, no. 4, pp. 297–303, May 2016, doi: 10.1016/j.tcm.2015.12.001.
16. F. Denorme, K. Vanhoorelbeke, and S. F. De Meyer, 'von Willebrand Factor and Platelet Glycoprotein Ib: A Thromboinflammatory Axis in Stroke', *Front Immunol*, vol. 10, p. 2884, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02884.
17. J. Hirsh et al., 'Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety', *CHEST*, vol. 119, no. 1, pp. 64S–94S, Jan. 2001, doi: 10.1378/chest.119.1_suppl.64S.
18. J. M. Connors and J. H. Levy, 'COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation.', *Blood*, vol. 135, no. 23, pp. 2033–2040, Jun. 2020, doi: 10.1182/blood.202006000.
19. C. Carallo et al., 'Higher heparin dosages reduce thromboembolic complications in patients with COVID-19 pneumonia', *J Investig Med*, Mar. 2021, doi: 10.1136/jim-2020-001628.
20. J. Gratz et al., 'Risk of Clinically Relevant Venous Thromboembolism in Critically Ill Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Front Med (Lausanne)*, vol. 8, p. 647917, 2021, doi: 10.3389/fmed.2021.647917.
21. V. Bianconi, F. Violi, F. Fallarino, P. Pignatelli, A. Sahebkar, and M. Pirro, 'Is Acetylsalicylic Acid a Safe and Potentially Useful Choice for Adult Patients with COVID-19?', *Drugs*, vol. 80, no. 14, pp. 1383–1396, Sep. 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01365-1.
22. A. N. Sveshnikova et al., 'Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 14, no. 10, pp. 2045–2057, 2016, doi: 10.1111/jth.13442.
23. N. A. Podoplelova et al., 'Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting', *Blood*, vol. 128, no. 13, pp. 1745–1755, 29 2016, doi: 10.1182/blood-2016-02-696898.
24. A. A. Ignatova et al., 'Flow cytometry for pediatric platelets', *Platelets*, vol. 30, no. 4, pp. 428–437, 2019, doi: 10.1080/09537104.2018.1513473.
25. H. H. Versteeg, J. W. M. Heemskerk, M. Levi, and P. H. Reitsma, 'New fundamentals in hemostasis', *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 327–358, Jan. 2013, doi: 10.1152/physrev.00016.2011.
26. D. Y. Nechipurenko et al., 'Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 39, no. 1, pp. 37–47, Jan. 2019, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311390.
27. M. T. G. Alonzo et al., 'Platelet Apoptosis and Apoptotic Platelet Clearance by Macrophages in Secondary Dengue Virus Infections', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 205, no. 8, pp. 1321–1329, Apr. 2012, doi: 10.1093/infdis/jis180.
28. G. D. Wool and J. L. Miller, 'The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation', *PAT*, pp. 1–13, Oct. 2020, doi: 10.1159/000512007.
29. Z. Younes et al., 'Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19', *Circulation Research*, vol. 0, no. 0, Oct. 2020, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317703.
30. J. M. Burkhardt et al., 'The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways', *Blood*, vol. 120, no. 15, pp. e73–e82, Oct. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-04-416594.
31. S. Zhang et al., 'SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19', *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 13, no. 1, p. 120, 2020, doi: 10.1186/s13045-020-00954-7.
32. F. Taus et al., 'Platelets Promote Thromboinflammation in SARS-CoV-2 Pneumonia', *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, p. 15.
33. S. Wolfram, 'Cellular automata as models of complexity', *Nature*, vol. 311, no. 5985, Art. no. 5985, Oct. 1984, doi: 10.1038/311419a0.
34. S. R. Patel, J. H. Hartwig, and J. E. Italiano, 'The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets', *J Clin Invest*, vol. 115, no. 12, pp. 3348–3354, Dec. 2005, doi: 10.1172/JCI26891.
35. R. S. Makar, O. S. Zhukov, M. A. Sahud, and D. J. Kuter, 'Thrombopoietin levels in patients with disorders of platelet production: diagnostic potential and utility in predicting response to TPO receptor agonists', *Am J Hematol*, vol. 88, no. 12, pp. 1041–1044, Dec. 2013, doi: 10.1002/ajh.23562.
36. K. M. Hoffmeister and H. Falet, 'Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance', *Thromb Res*, vol. 141 Suppl 2, pp. S68–72, May 2016, doi: 10.1016/S0049-3848(16)30370-X.
37. V. V. Bodrova, O. N. Shustova, S. G. Khaspekova, and A. V. Mazurov, 'Platelet reticulated forms, size indexes, and functional activity. Interactions in healthy volunteers', *Platelets*, pp. 1–6, May 2021, doi: 10.1080/09537104.2021.1922659.
38. L. Hille et al., 'Ultrastructural, transcriptional, and functional differences between human reticulated and non-reticulated platelets', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 18, no. 8, pp. 2034–2046, 2020, doi: 10.1111/jth.14895.
39. S. Chakraborty et al., 'Investigation of the efficacy and safety of eltrombopag to correct thrombocytopenia in moderate to severe dengue patients - a phase II randomized controlled clinical trial', *EClinicalMedicine*, vol. 29, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100624.

40. D. Schmoeller, M. M. Picarelli, T. Paz Munhoz, C. E. Poli de Figueiredo, and H. L. Staub, 'Mean Platelet Volume and Immature Platelet Fraction in Autoimmune Disorders', *Front Med (Lausanne)*, vol. 4, Sep. 2017, doi: 10.3389/fmed.2017.00146.
41. S. Kovács, Z. Csiki, K. S. Zsóri, Z. Bereczky, and A. H. Shemirani, 'Characteristics of platelet count and size and diagnostic accuracy of mean platelet volume in patients with venous thromboembolism. A systematic review and meta-analysis', *Platelets*, vol. 30, no. 2, pp. 139–147, Feb. 2019, doi: 10.1080/09537104.2017.1414175.
42. W. Chen and J. Y. Pan, 'Anatomical and Pathological Observation and Analysis of SARS and COVID-19: Microthrombosis Is the Main Cause of Death', *Biological Procedures Online*, vol. 23, no. 1, p. 4, Jan. 2021, doi: 10.1186/s12575-021-00142-y.
43. S. Yin, M. Huang, D. Li, and N. Tang, 'Difference of coagulation features between severe pneumonia induced by SARS-CoV2 and non-SARS-CoV2', *J Thromb Thrombolysis*, Apr. 2020, doi: 10.1007/s11239-020-02105-8.
44. N. Ozcelik, S. Ozyurt, B. Y. Kara, A. Gumus, and U. Sahin, 'The value of the platelet count and platelet indices in differentiation of COVID-19 and influenza pneumonia', *Journal of Medical Virology*, vol. 93, no. 4, pp. 2221–2226, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.26645>.
45. R. Likic and D. Kuzmanic, 'Severe thrombocytopenia as a complication of acute Epstein-Barr virus infection', *Wien Klin Wochenschr*, vol. 116, no. 1, pp. 47–50, Jan. 2004, doi: 10.1007/BF03040424.
46. A.-M. Albanyan, M. F. Murphy, J. T. Rasmussen, C. W. Heegaard, and P. Harrison, 'Measurement of phosphatidylserine exposure during storage of platelet concentrates using the novel probe lactadherin: a comparison study with annexin V', *Transfusion*, vol. 49, no. 1, pp. 99–107, Jan. 2009, doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01933.x.
47. N. A. Podoplelova, D. Y. Nechipurenko, A. A. Ignatova, A. N. Sveshnikova, and M. A. Panteleev, 'Procoagulant Platelets: Mechanisms of Generation and Action', *Hamostaseologie*, vol. 41, no. 2, pp. 146–153, Apr. 2021, doi: 10.1055/a-1401-2706.
48. J. W. Heemskerk, W. M. Vuist, M. A. Feijge, C. P. Reutelingsperger, and T. Lindhout, 'Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses', *Blood*, vol. 90, no. 7, pp. 2615–2625, Oct. 1997.
49. A. C. Kirkpatrick, A. J. Tafur, A. S. Vincent, G. L. Dale, and C. I. Prodan, 'Coated-Platelets Improve Prediction of Stroke and Transient Ischemic Attack in Asymptomatic Internal Carotid Artery Stenosis', *Stroke*, vol. 45, no. 10, pp. 2995–3001, Oct. 2014, doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006492.
50. M. Schouten, W. J. Wiersinga, M. Levi, and T. van der Poll, 'Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis', *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 83, no. 3, pp. 536–545, 2008, doi: 10.1189/jlb.0607373.
51. S. M. Armstrong, S. Mubareka, and W. L. Lee, 'The lung microvascular endothelium as a therapeutic target in severe influenza', *Antiviral Research*, vol. 99, no. 2, pp. 113–118, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.05.003.
52. X. Yang et al., 'Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 18, no. 6, pp. 1469–1472, 2020, doi: 10.1111/jth.14848.
53. J. Thachil et al., 'ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 18, no. 5, pp. 1023–1026, 2020, doi: 10.1111/jth.14810.
54. T. E. Warkentin and J. G. Kelton, 'Temporal Aspects of Heparin-Induced Thrombocytopenia', *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 17, pp. 1286–1292, Apr. 2001, doi: 10.1056/NEJM200104263441704.
55. T. E. Warkentin et al., 'Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin.', *The New England journal of medicine*, vol. 332, no. 20, pp. 1330–1335, May 1995, doi: 10.1056/NEJM199505183322003.
56. C. S. Kow and S. S. Hasan, 'Use of antiplatelet drugs and the risk of mortality in patients with COVID-19: a meta-analysis', *J Thromb Thrombolysis*, Apr. 2021, doi: 10.1007/s11239-021-02436-0.
57. J. F.-W. Chan et al., 'Treatment With Lopinavir/Ritonavir or Interferon-β1b Improves Outcome of MERS-CoV Infection in a Nonhuman Primate Model of Common Marmoset.', *The Journal of infectious diseases*, vol. 212, no. 12, pp. 1904–1913, Dec. 2015, doi: 10.1093/infdis/jiv392.
58. I. F.-N. Hung et al., 'Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial.', *Lancet (London, England)*, vol. 395, no. 10238, pp. 1695–1704, May 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)31042-4.
59. M. Edvardsson, M. Oweling, and P. Järemo, 'Small procoagulant platelets in diabetes type 2', *Thromb Res*, vol. 195, pp. 1–7, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.thromres.2020.06.033.
60. M. J. Stotts, J. P. E. Davis, and N. L. Shah, 'Coagulation testing and management in liver disease patients', *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 36, no. 3, pp. 169–176, May 2020, doi: 10.1097/MOG.0000000000000635.
61. E. Vrigkou et al., 'Platelet and coagulation disorders in newly diagnosed patients with pulmonary arterial hypertension', *Platelets*, vol. 30, no. 5, pp. 646–651, 2019, doi: 10.1080/09537104.2018.1499890.
62. N. Curry, A. Raja, J. Beavis, S. Stanworth, and P. Harrison, 'Levels of procoagulant microvesicles are elevated after traumatic injury and platelet microvesicles are negatively correlated with mortality', *J Extracell Vesicles*, vol. 3, p. 25625, 2014, doi: 10.3402/jev.v3.25625.

Фосфотидилинозитол-содержащие везикулы необходимы для активации PLC ζ в соответствии с предсказанием математической модели

А.К. Табачник^{1#}

1. Физический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Автор для переписки: atabachnick@mail.ru

Аннотация

Фосфолипаза C ζ (PLC ζ) — фермент цитоплазмы и акросомы сперматозоидов млекопитающих. Он катализирует реакцию гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-фосфата на инозитол-3-фосфат и диацилглицерин. PLC ζ присутствует в акросоме и цитозоле покоящихся сперматозоидов, но не оказывает значительного влияния на их метаболизм. После слияния сперматозоидов и оболочек яйцеклетки активность PLC ζ возрастает, поскольку он начинает связывать оболочки яйцеклетки. Причины, по которым PLC ζ неактивна в сперматозоидах или соматических клетках любого типа, неизвестны.

В настоящей работе была разработана модель, описывающая активность PLC ζ при физиологических концентрациях кальция. Теоретическое моделирование в данной работе объясняет отсутствие активности PLC ζ в любом типе клеток млекопитающих, кроме яиц. Было показано, что присутствие богатых фосфоинозитолом везикул необходимо для активности PLC ζ в зрелых яйцах млекопитающих.

Ключевые слова: Фосфолипаза C ζ , Ооциты, Сперматозоид, Кальциевая сигнализация

Введение

При оплодотворении млекопитающих сперма вызывает серию колебаний кальция в яйцеклетке, которые вызывают активацию яйцеклетки и раннее эмбриональное развитие [1]. Фосфолипаза C (PLC) ζ — это специфичный для сперматозоидов белок, способный вызывать высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных хранилищ [2]. PLC ζ — это фермент, который катализирует реакцию гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-фосфата (PIP₂) на инозитол-3-фосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG). Он присутствует в акросоме и цитозоле сперматозоидов, но не оказывает значительного влияния на их метаболизм. Однако после слияния сперматозоидов и яйцеклетки его активность

увеличивается, поскольку PLC ζ начинает связывать мембраны яйцеклетки и генерировать IP₃ [3]. PLC ζ может также инициировать колебания кальция в ооцитах без сперматозоидов, если его экспрессия в ооците искусственно активирована [2]. Некоторые яйцеклетки, оплодотворенные PLC ζ -нулевой спермой, могут развиваться, хотя и со значительно меньшей эффективностью, и после значительной временной задержки [4].

Один из основных вопросов о PLC ζ - причина отсутствия его активности в сперматозоидах и клетках других типов, таких как клетки яичников китайского хомячка (CHO) [5]. Несколько гипотез объясняют причину активности PLC ζ исключительно в ооцитах (рис. 1). Одна из них предполагает наличие неизвестного кофактора, активирующего PLC ζ (рис. 1A). Этот кофактор может находиться в цитозоле ооцита [3]. Альтернативное объяснение предполагает, что в сперматозоиде PLC ζ связан с каким-то ингибитором (рис. 1B), и после слияния с ооцитом комплекс с ингибитором растворяется. Эта гипотеза частично противоречит данным [5], где продемонстрировано, что при экспрессии в клетках яичников китайского хомячка PLC ζ не оказывает значительного влияния на концентрацию кальция. Ни одна из этих гипотез не подтверждается прямыми доказательствами.

Альтернативная гипотеза основана на наличии везикул, богатых PIP₂, в ооцитах (Fig. 1C, D). Эти везикулы имеют гораздо большее относительное поверхностное пространство, нежели мембрана, и было продемонстрировано, что большая часть PLC ζ связывается с этими везикулами [6], [5].

Ранее с помощью компьютерного моделирования было успешно показан механизм инициации кальциевой сигнализации как в сперматозоидах, так и в яйцеклетках [7], [8], однако работы по регуляции активности PLC ζ отсутствуют. В этой работе математическое моделирование будет использовано для исследования механизмов регуляции активности PLC ζ в сперматозоидах и яйцеклетках.

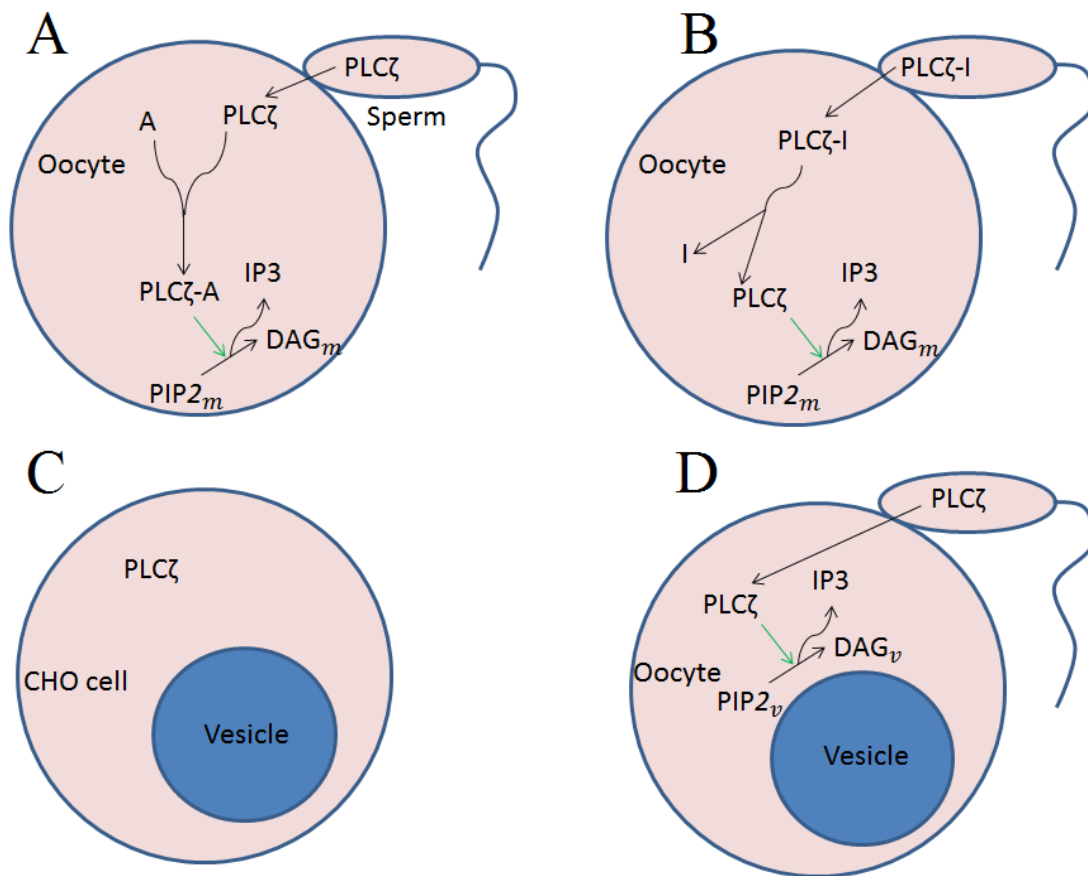


Рисунок 1. Основные гипотезы, объясняющие активность PLC ζ в ооците. (А) Первая гипотеза состоит в том, что PLC ζ приобретает способность расщеплять мембранный PIP2 ооцита ($[PIP2]_m$) и продуцировать IP3 при активации неопределенным активатором присутствующим в ооцитах. (В) Вторая гипотеза: наличие неуточненного ингибитора PLC ζ во всех типах клеток, кроме яиц (С, D). Третья гипотеза предполагает, что ооциты млекопитающих содержат везикулы с более высоким содержанием PIP2 ($[PIP2]_v$), а PLC ζ направляется на поверхность этих везикул.

Материалы и Методы

Построение и интегрирование компьютерной модели

Для изучения активности PLC ζ в яйцах млекопитающих была разработана компьютерная модель. Сначала были построены обыкновенные дифференциальные уравнения на основе законов химической кинетики (закона действия масс, кинетики Генри-Михаэлиса-Ментена, уравнения Хилла). Параметры кинетического уравнения были взяты из литературы или оценены на основе имеющихся экспериментальных данных. Окончательная модель состояла из 18 уравнений с двумя неизвестными параметрами. Модель решалась методом LSODA.

Результаты и Обсуждение

Математическая модель активности PLC ζ

Прежде чем проверять вышеописанные гипотезы была разработана математическая модель активации PLC ζ , способная описать

существующие экспериментальные данные [6], [9]. По мнению многих авторов ([6], [9]), уникальной особенностью PLC ζ является его высокая кооперативность для связывания Ca²⁺, которая осуществляется её четырьмя EF-доменами. Коэффициент Хилла для данного белка варьируется от 3.8 до 4.3 ([10], [11], [5], [9]) по разным источникам. Однако, как показано ниже, такое высокое значение коэффициента Хилла несовместимо с данными, представленными в этих статьях. Поэтому коэффициент Хилла рассчитывался двумя разными методами. Было показано, что его значение, по данным [10], близко к 1.1.

Была создана простая математическая модель, которая могла предсказать зависимость активности PLC ζ от кальция при его физиологически значимых концентрациях (10⁻⁸ - 10⁻⁶ M). Модель была основана на уравнении Клотца (1) и гипотезе о том, что каждый следующий ион кальция связывается с коэффициентом равновесия, равным предыдущему, умноженным на константу кооперативности α (2-5):

$$B = \frac{[PLCz_Ca] + 2 * [PLCz_2Ca] + 3 * [PLCz_3Ca] + 4 * [PLCz_4Ca]}{PLCtotal} = \frac{Keq * [Ca] + 2 * a * Keq^2 * [Ca]^2 + 3 * a^3 * Keq^3 * [Ca]^3 + 4 * a^6 * Keq^4 * [Ca]^4}{1 + Keq * [Ca] + a * Keq^2 * [Ca]^2 + a^3 * Keq^3 * [Ca]^3 + a^6 * Keq^4 * [Ca]^4} \quad (1)$$

$$K2 = K1 * a \quad (2)$$

$$K3 = K1 * a^2 \quad (3)$$

$$K4 = K1 * a^3 \quad (4)$$

$$Kr = K1 / Keq \quad (5)$$

$$\frac{d[PLCz]}{dt} = -K1 * [Ca] * [PLCz] + Kr * [PLCz_Ca] \quad (6)$$

$$\frac{d[PLCz_Ca]}{dt} = K1 * [Ca] * [PLCz] - Kr * [PLCz_Ca] - K2 * [Ca] * [PLCz_Ca] + Kr * [PLCz_2Ca] \quad (7)$$

$$\frac{d[PLCz_2Ca]}{dt} = K2 * [Ca] * [PLCz_Ca] - Kr * [PLCz_2Ca] - K3 * [Ca] * [PLCz_2Ca] + Kr * [PLCz_3Ca] \quad (8)$$

$$\frac{d[PLCz_3Ca]}{dt} = K3 * [Ca] * [PLCz_2Ca] - Kr * [PLCz_3Ca] - K4 * [Ca] * [PLCz_3Ca] + Kr * [PLCz_4Ca] \quad (9)$$

$$\frac{d[PLCz_4Ca]}{dt} = K4 * [Ca] * [PLCz_3Ca] - Kr * [PLCz_4Ca] \quad (10)$$

здесь **K1** - константа для связывания первого иона кальция, **K2** - для связывания второго иона кальция, **K3** - для третьего, **K4** - для четвертого, **Keq** - константа равновесия для первой реакции связывания иона кальция, **Kr** - константа обратной реакции для каждого шага, **a** - константа кооперативности, **[PLCz_Ca]** - концентрация **PLCz**, связанного с одним ионом Ca^{2+} в установившемся состоянии, **[PLCz_2Ca]** - концентрация **PLCz**, связанного с двумя ионами Ca^{2+} в установившемся состоянии, **[PLCz_3Ca]** с тремя, **[PLCz_4Ca]** с четырьмя. **PLCtotal** — это суммарная концентрация всех форм **PLCz**. **B** - параметр в уравнении Клотца, представляющий молярное соотношение общего **PLCz** и связанного с ним кальция.

Используя уравнения 2-5, была разработана математическая модель, основанная на законе действия масс. Концентрация кальция в этой модели была фиксированной, а переменные представляют динамику **PLCz**, связанного с различным количеством ионов кальция:

здесь **K1** - константа для связывания первого иона Ca^{2+} , **K2** - для второго, **K3** - для третьего, **K4** - для четвертого, **Keq** - константа равновесия для первой реакции связывания иона Ca^{2+} , **Kr** - константа обратной реакции для каждого шага, **a** - константа кооперативности, **[PLCz]**. Концентрация **PLCz**, **[PLCz_Ca]** — это концентрация **PLCz**, связанного с одним ионом Ca^{2+} в установившемся состоянии, **[PLCz_2Ca]** - концентрация **PLCz**, связанного с двумя ионами Ca^{2+} в установившемся состоянии, **[PLCz_3Ca]** - с тремя, **[PLCz_4Ca]** - с четырьмя.

Исследование стационарного состояния модели приведено на рисунке S1.

% активной **PLCz** рассчитывался как:

$$\frac{0.03 * [PLCz_2Ca] + 0.22 * [PLCz_3Ca] + [PLCz_4Ca]}{PLCtotal} = \% \text{ of activity} \quad (11)$$

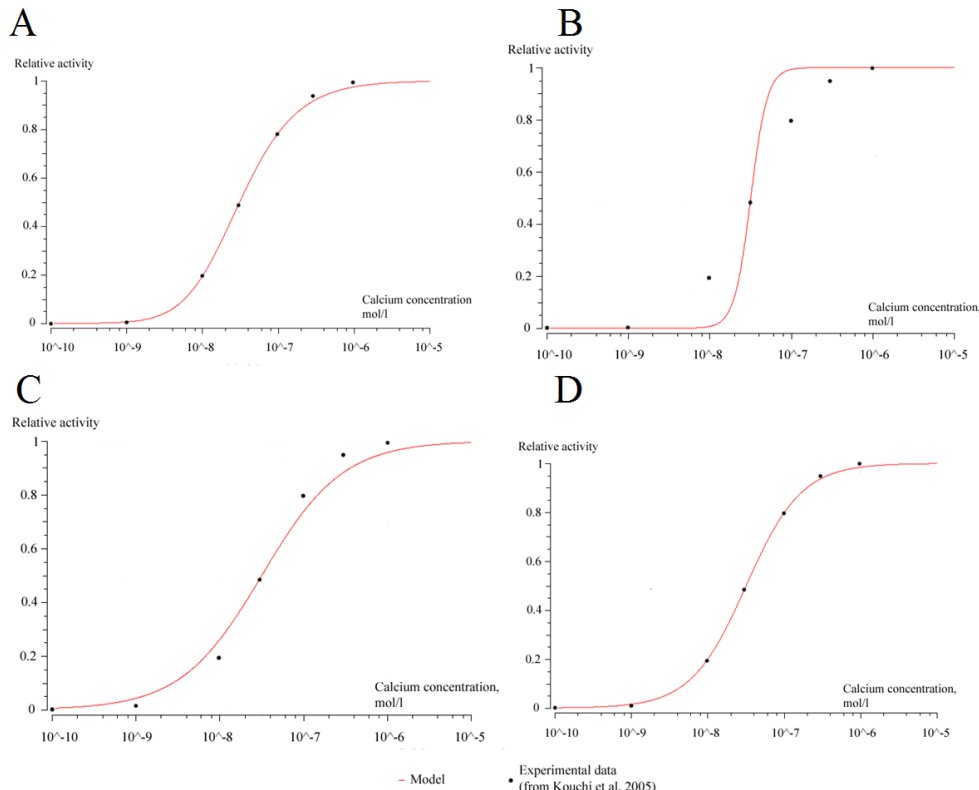


Рисунок 2. Проверка моделей. (А) Подтверждение нашей модели связывания кальция с экспериментальными данными из [10]. (В) Сравнение уравнения Хилла для $n = 4.3$ с экспериментальными данными из [10]. (С) Сравнение уравнения Хилла для $n = 0.9$ с экспериментальными данными из [10]. (D) Сравнение уравнения Хилла для $n = 1.1$ с экспериментальными данными из [10].

Этот параметр зависит от концентраций форм PLCζ, связанных с двумя, тремя или четырьмя ионами кальция. Коэффициенты для пересчета активности концентраций этих форм взяты из данных о максимальной активности PLCζ с удалением одной или двух EF-рук [12]. Для PLCζ, связанного с тремя ионами кальция, использовали данные о PLCζ с одной делецией EF-hand (в данном случае активность составляла 22% от активности нативной формы фермента). Для PLCζ, связанного с двумя ионами кальция, использовали данные о PLCζ с двумя делециями EF-hand (в данном случае активность составляла 0,03% от активности нативной формы фермента).

Подбор параметров модели проводился с использованием генетического алгоритма. Экспериментальная активность фермента по отношению к максимуму (% активности) была получена из литературных данных.

Модель предсказала константу равновесия $K_{eq} = 8,3 * 10^8 M^{-1}$ и константу кооперативности $a = 0.33$. Используя эти значения, была построена зависимость активности PLCζ от концентрации кальция (рис. 2А).

Аппроксимация активности PLCζ с помощью уравнения Хилла

В качестве альтернативного подхода к описанию активности PLCζ мы использовали уравнение Хилла. Уравнение Хилла для

$$\frac{E}{E_{max}} = \frac{[Ca]^{n}}{[EC50]^{n} + [Ca]^{n}} \quad (12)$$

фермента имеет следующий вид:

где E - активность PLCζ, E_{max} - максимальная активность PLCζ, EC50 - концентрация кальция, необходимая для 50% активности, [Ca] - концентрация кальция, n - коэффициент Хилла.

Если мы возьмем коэффициент Хилла из [11], (n = 4.3), будет получена кальциевая зависимость, которую можно наблюдать на рис. 2В. Данная зависимость аппроксимирует экспериментальные данные с гораздо большим стандартным отклонением, нежели наша модель, описанная в (6) - (10). То же верно и для коэффициента Хилла, полученного из [12] (n = 0.9).

Коэффициент Хилла можно оценить по данным о концентрации кальция при различных активностях (EC90 и EC10 - 90% и 10% от максимальной активности соответственно).

$$n = \frac{\log_{10}(91)}{\log_{10}(EC90/EC10)} \quad (13)$$

Для активности PLCζ, предсказанной нашей моделью, EC90 составляет $2,7 * 10^{-7} M$, а EC10 - $5,3 * 10^{-9} M$. Используя уравнение (13), мы можем найти, что коэффициент Хилла для PLCζ равен до 1.12.

Аналогично были исследованы данные из [11]. Для PLCζ EC90 составляет $4,3 * 10^{-7} M$, а EC10 - $10^{-8} M$. Используя то же уравнение (13), мы можем найти, что фактический экспериментальный коэффициент Хилла для PLCζ приблизительно равен равно 1.1, что хорошо соответствует предсказаниям нашей модели.

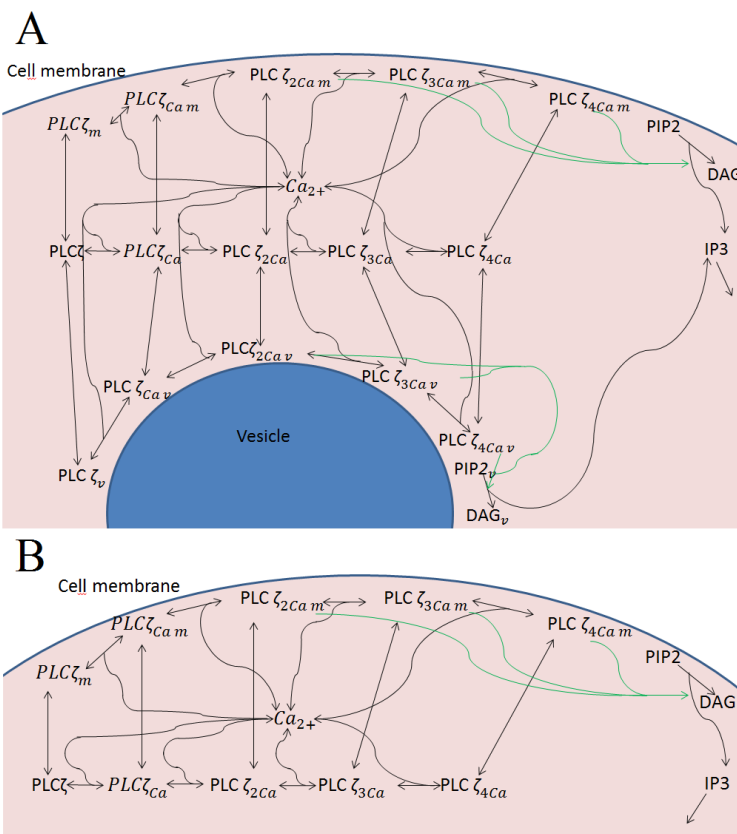


Рисунок 3. Схема полной модели. (А) Реакции в ооците. PLCζ - бескальциевый PLCζ, PLCζ_{Ca} - PLCζ, связанный с одним ионом кальция, PLCζ_{2Ca} - PLCζ, связанный с двумя ионами кальция, PLCζ_{3Ca} - с тремя, PLCζ_{4Ca} - с четырьмя. PLCζ_m - PLCζ, связанный с клеточной мембраной, PLCζ_(Ca m) - PLCζ, связанный с клеточной мембраной и одним ионом кальция, PLCζ_(2Ca m) - PLCζ, связанный с клеточной мембраной и двумя ионами кальция, PLCζ_(3Ca m) - с клеточной мембраной и тремя ионами кальция, PLCζ_(4Ca m) - с клеточной мембраной и четырьмя ионами кальция. PIP2 и PIP_v - фосфатидилинозитол-4,5 - бисфосфат на мембране клеток и везикул соответственно. DAG и DAG_v - диацилглицерол на клеточной мембране и везикулах соответственно. IP3 - инозитол-3-фосфат. PLCζ_v - PLCζ, связанный с везикулами, PLCζ_(Ca v) - PLCζ, связанный с везикулами и одним ионом кальция, PLCζ_(2Ca v) - PLCζ, связанный с везикулами и двумя ионами кальция, PLCζ_(3Ca v) - с везикулами и тремя ионами кальция, PLCζ_(4Ca v) - с везикулами и четырьмя ионами кальция. (В) Модель сперматозоида идентична модели ооцита, за исключением отсутствия везикул.

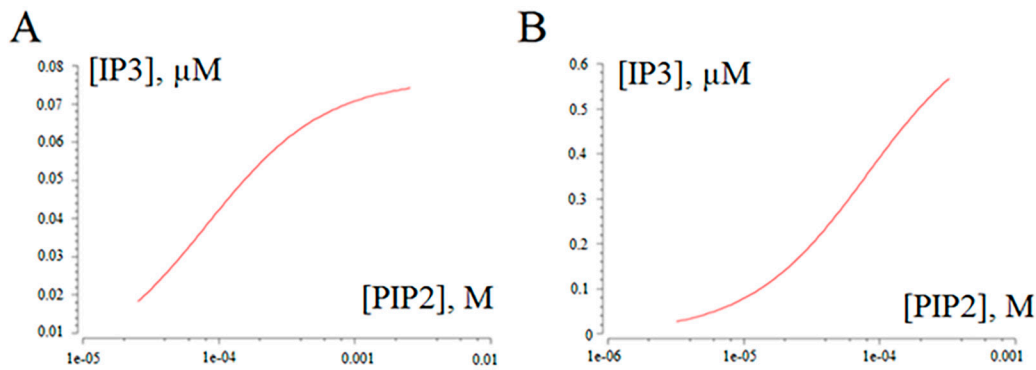


Рисунок 4. Результаты работы полной модели. (А) Зависимость концентрации IP3 от содержания PIP2 в мембране сперматозоидов. (В) Зависимость концентрации IP3 от содержания PIP2 в везикулах ооцитов.

Полная модель активности фосфолипазы C в сперматозоидах и яйцеклетках млекопитающих

Была разработана полная модель активности PLC ζ в яйцеклетках (рис. 3А) и на мембранах сперматозоидов (рис. 3В). Для сперматозоидов и яйцеклеток использовались два похожих набора реакций. PLC ζ могла независимо связывать кальций и доступные плазматические мембраны, но только форма, которая была связана как с мембраной, так и с четырьмя ионами кальция, могла производить IP3. IP3 удалялся из системы с постоянной скоростью. Различия между двумя моделями заключались в следующем: яйцеклетка содержит везикулы, богатые фосфоинозитидами, а сперматозоиды - нет. Все реакции, происходящие на мембране везикул, дублируют реакции, происходящие на плазмалемме. Константы реакции между схемами не различались, за исключением наличия отдельной константы для связывания PLC с везикулами в модели ооцита и константы скорости деградации инозитол-3-фосфата.

С использованием схем, описанных выше, были созданы две модели: модель активности PLC ζ в ооците (рис. 3, А) и в сперматозоидах (рис. 3, В). Уравнения моделей описаны в S2. Подробная информация о параметрах моделей представлена в Таблице S1.

Зависимость концентрации IP3 от концентрации PIP2 на различных мембранах показана на рис. 4. В обеих моделях существовало только одно стационарное состояние. Стационарная концентрация IP3 в сперматозоиде составляла приблизительно 50-60 нМ, а в ооците концентрация IP3 составляла около 200 нМ (что выше порога ответа 130 нМ [13] для рецепторов IP3, присутствующих как в сперматозоидах, так и в ооцитах [13]). Таким образом, согласно точечной модели, активности одной только PLC ζ должно быть достаточно, чтобы инициировать колебания кальция в ооците.

В сперматозоиде конечная концентрация инозитол-3-фосфата, в зависимости от концентрации PIP2, достигает плато задолго до достижения даже половины пороговой концентрации (130 нМ).

Снижение концентрации фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата на поверхности везикул в 10 раз снизит конечную концентрацию инозитол-3-фосфата примерно до 20-30 нМ и исключит возможность кальциевых колебаний в ооците, вызванных исключительно PLC ζ (рис. 4В). Это объясняет как отсутствие колебаний при инициации экспрессии PLC ζ в соматических клетках [2], так и отсутствие колебаний в аналогичных условиях на ранних стадиях созревания ооцитов до образования везикул, богатых фосфатидинозитол-4,5-бисфосфатом [16].

Заключение

Здесь мы построили математическую модель активности PLC ζ в яйцеклетках и сперматозоидах млекопитающих и проверили ее на существующих экспериментальных данных. Теоретически было показано, что активность PLC ζ в сперматозоидах недостаточна для синтеза IP3 в количествах, достаточных для инициации кальциевых колебаний. Благодаря везикулам в яйцеклетках PLC ζ может наработать общую концентрацию IP3, близкую к 200 нМ, что выше граничного значения для инициирования колебаний Ca.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что фосфоинозитидный состав везикул яйцеклеток является основным фактором эффективности PLC ζ как инициатора кальциевых колебаний. Они исключают возможность кальциевых колебаний в сперматозоиде, что согласуется со всеми имеющимися в настоящее время экспериментальными данными.

Вклад авторов

Работа была полностью выполнена А.К.Т.

Благодарности

Автор выражает благодарность Юлии Джессике Коробкиной и Анастасии Свешниковой (ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия) за ценные обсуждения, при выполнении данной работы.

Список литературы

1. Saleh A, Kashir J, Thanassoulas A, Safieh-Garabedian B, Lai FA, Nomikos M. Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00028>.
2. Yoshida N, Amanai M, Fukui T, Kajikawa E, Brahmajosyula M, Iwahori A, et al. Broad, ectopic expression of the sperm protein PLCZ1 induces parthenogenesis and ovarian tumours in mice. *Development* 2007;134:3941–52. <https://doi.org/10.1242/dev.007930>.
3. Kashir J, Nomikos M, Lai FA. Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions. *Advances in Biological Regulation* 2018;67:148–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.10.012>.
4. Hachem A, Godwin J, Ruas M, Lee HC, Buitrago MF, Ardestani G, et al. PLC ζ is the physiological trigger of the Ca $^{2+}$ oscillations that induce embryogenesis in mammals but offspring can be conceived in its absence. *Development* 2017. <https://doi.org/10.1242/dev.150227>.
5. Phillips S V., Yu Y, Rossbach A, Nomikos M, Vassilakopoulou V, Livaniou E, et al. Divergent effect of mammalian PLC ζ in generating Ca $^{2+}$ oscillations in somatic cells compared with eggs. *Biochemical Journal* 2011;438:545–53. <https://doi.org/10.1042/BJ20101581>.
6. Nomikos M, Swann K, Lai FA. Starting a new life: Sperm PLC-zeta mobilizes the Ca $^{2+}$ signal that induces egg activation and embryo development. *BioEssays* 2012;34:126–34. <https://doi.org/10.1002/bies.201100127>.
7. Atri A, Amundson J, Clapham D, Sneyd J. A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the *Xenopus laevis* oocyte. *Biophysical Journal* 1993;65:1727–39. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81191-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81191-3).
8. Simons J, Fauci L. A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Bulletin of Mathematical Biology* 2018;80:2481–501. <https://doi.org/10.1007/s11538-018-0478-3>.
9. Nomikos M, Theodoridou M, Elgmati K, Parthimos D, Calver BL, Buntwal L, et al. Human PLC exhibits superior fertilization potency over mouse PLC in triggering the Ca $^{2+}$ oscillations required for mammalian oocyte activation. *Molecular Human Reproduction* 2014;20:489–98. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau011>.
10. Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T, et al. Recombinant Phospholipase C ζ Has High Ca $^{2+}$ Sensitivity and Induces Ca $^{2+}$ Oscillations in Mouse Eggs. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:10408–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313801200>.
11. Nomikos M, Blayney LM, Larman MG, Campbell K, Rossbach A, Saunders CM, et al. Role of Phospholipase C- ζ Domains in Ca $^{2+}$ -dependent Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Hydrolysis and Cytoplasmic Ca $^{2+}$ Oscillations. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:31011–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500629200>.
12. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S. The Role of EF-hand Domains and C2 Domain in Regulation of Enzymatic Activity of Phospholipase C ζ . *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:21015–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412123200>.
13. De Young GW, Keizer J. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca $^{2+}$ concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:9895–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9895>.
14. Kuroda Y, Kaneko S, Yoshimura Y, Nozawa S, Mikoshiba K. Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$) receptors in human sperm? *Life Sciences* 1999;65:135–43. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00230-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00230-1).
15. Cai X, Li X, Qi H, Wei F, Chen J, Shuai J. Comparison of gating dynamics of different IP $_3$ R channels with immune algorithm searching for channel parameter distributions. *Physical Biology* 2016;13:056005. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/5/056005>.
16. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996;379:364–8. <https://doi.org/10.1038/379364a0>.

Современные подходы к моделированию тромбоза и гемостаза *in vitro*

А.Е. Асадов^{1*}, И.К. Чудинов^{1*}, Д.Ю. Нечипуренко^{2,3,4#}

1. Факультет Биологической и Медицинской Физики, Московский Физико-Технический Институт, Долгопрудный, Россия
2. Физический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
3. Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, Москва, Россия
4. Национальный Медицинский Исследовательский Центр Детской Гематологии Онкологии и Иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия

Автор для переписки: ne4ipur@gmail.com

* авторы сделали одинаковый вклад в работу

Аннотация

Нарушения в работе системы гемостаза отвечают за большое количество жизнеугрожающих состояний, однако несмотря на многие десятилетия исследований, на сегодняшний день не существует надежных способов корректировать состояние гемостаза без значимых рисков развития тромбозов или кровотечений. Данная ситуация отражает недостаточный уровень понимания ключевых механизмов, которые регулируют гемостатический ответ в норме и при патологии. Для развития фундаментальных представлений о принципах регуляции гемостаза сегодня активно применяются как экспериментальные модели, так и теоретические подходы. Данный обзор посвящен современным *in vitro* моделям тромбоза и гемостаза и фокусируется на ключевых подходах и инструментах, используемых для изучения процесса свертывания крови вне организма человека. Для воссоздания данного процесса сегодня активно применяются технологии микрофлюидики, а также подходы к созданию искусственных сосудов на основе разнообразных гидрогелей. *In vitro* модели тромбоза традиционно имитируют непроницающее повреждение сосудистой стенки в условиях потока крови и уже более 30 лет исследуются для изучения ключевых процессов, отвечающих за формирование артериальных тромбов – патологических сгустков, которые могут привести к значительному уменьшению кровоснабжения жизненно важных органов. Модели гемостаза *in vitro* получили активное развитие лишь в последние годы и фокусируются на установлении важных закономерностей образования гемостатических пробок – сгустков, блокирующих кровопотерю в случае проникающего повреждения сосуда. Современные *in vitro* модели тромбоза и гемостаза

используются не только как инструменты для фундаментальных исследований, но и в ряде случаев внедряются в клиническую практику в качестве интегральных методов диагностики нарушений гемостаза.

Ключевые слова: Тромбоз, Гемостаз, Тромбоциты, Микрофлюидика, Гидрогель, Цельная кровь, *In vitro* модели

Список аббревиатур: PDMS — polydimethylsiloxane - полидиметилсилоксан; HUVEC — Human Umbilical Vein Endothelial Cells - эндотелиальные клетки пупочной вены человека; CFD – computational fluid dynamics - вычислительная гидродинамика; TF - tissue factor - тканевый фактор; GelMA - methacrylate-gelatin - метилакрилат желатин

Введение

На сегодняшний день система гемостаза человека остается предметом активных исследований в первую очередь из-за большой клинической значимости: одни только осложнения, вызванные артериальным тромбозом, являются наиболее распространенной причиной смерти и инвалидности людей в развитых странах [1]. Ключевыми методами исследования физиологии гемостаза на сегодняшний день остаются животные *in vivo* модели [2], а также *in vitro* [3-5] и *in silico* [6] подходы.

In vitro модели позволяют реконструировать процессы гемостатического ответа вне организма в хорошо контролируемых условиях, что представляет особую ценность ввиду чрезвычайной сложности устройства системы гемостаза. Такие модели также представляют большую ценность как потенциальные системы для оценки состояния гемостаза в клинических и

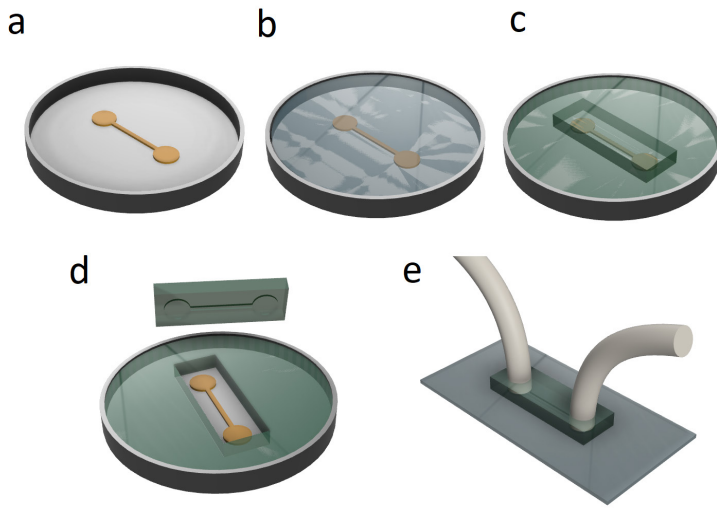


Рисунок 1. Создание PDMS-камеры: а) Мастер форму готовят с использованием фотолитографии. Рельеф (обычно сделанный из фоторезиста на кремниевой пластине, показано оранжевым) обычно содержит несколько паттернов для печати на PDMS; б) Рельефную форму (мастер форму) заливают жидкой смесью из основы PDMS с затвердителем; с-д) Часть полимеризованного PDMS затем отрезается и удаляется из формы, е) делаются отверстия для втока и вытока, и присоединяются необходимые трубки. Камера прикрепляется к стеклянному или пластиковому покровному стеклу (серое) с помощью плазменной сварки или вакуумной герметизации.

амбулаторных условиях, а также как инструменты для разработки новых лекарственных препаратов, так как позволяют работать с кровью людей.

В данном обзоре дается современный срез наиболее значимых по мнению авторов *in vitro* подходов, предложенных в последние годы для исследования тромбоза и гемостаза. В соответствии с традиционными представлениями, структура данной работы подразумевает разделение моделей тромбоза, которые имитируют формирование внутрисосудистых сгустков, и моделей гемостаза, которые ставят своей целью реконструировать процессы, происходящие при проникающем повреждении сосуда и в норме приводящие к быстрой остановке кровопотери.

В нашей работе мы будем фокусироваться в большей степени на технологических аспектах устройства таких моделей, нежели на биологических или клинических результатах, полученных с их помощью.

In vitro модели тромбоза

Микрофлюидные модели

Одним из наиболее популярных и зарекомендовавших себя подходов к созданию проточных камер для моделирования тромбоза сегодня является использование PDMS в качестве материальной основы, формирующей геометрию каналов. Прозрачность PDMS, его биологическая инертность, а также прекрасное сочетание с технологией фотолитографии, привели к бурному развитию микрофлюидики и ее активному применению в различных задачах биологии и медицины. Применение этой технологии для воссоздания процесса свертывания крови вне организма позволяет регулировать значительную часть параметров эксперимента: геометрию канала или сосуда, давление в канале, скорость потока и скорость сдвига, расположение активатора, инициирующего образование тромба,

введение различных растворов в систему. Для создания такой проточной камеры, как правило, используются так называемые микрофлюидные чипы - спроектированные и созданные методами фотолитографии формы для заливки, определяющие геометрию создаваемых каналов. Тандем фотолитографии и полимеризующегося эластомера (PDMS) получил название мягкой литографии и проиллюстрирован на Рис.1.

К ключевым параметрам экспериментов по тромбообразованию в условиях потока можно отнести: геометрию канала (форма, характерный размер), пристеночную скорость сдвига (как правило варьируется в диапазоне от 100 до 2000 c^{-1}), биохимический состав и геометрию области с активатором тромбообразования (как правило используется фибриллярный коллаген первого типа и тканевый фактор), источник и состав крови (организм, из которого взята кровь, тип антикоагулянтов, наличие дополнительных веществ в крови).

Примером изящного применения технологии микрофлюидики для изучения тромбообразования и молекулярных механизмов, ответственных за определенные этапы формирования тромбов является классическая работа исследователей из Университета Пенсильвании [7]. Данный подход, за счет использования крови мышей дикого типа и различных нокаутных линий, позволяет оценивать вклад определенных рецепторов тромбоцитов в процесс тромбообразования в контролируемых гемодинамических условиях. Для существенного уменьшения объемов используемой крови исследователи значительно уменьшили геометрические размеры каналов (100 на 100 микрометров), что стало возможным благодаря использованию технологии фотолитографии. Для инициации процесса тромбообразования авторами использовался наиболее широко применяемый активатор - фибриллярный коллаген первого типа, наносимый на предварительно очищенное предметное стекло

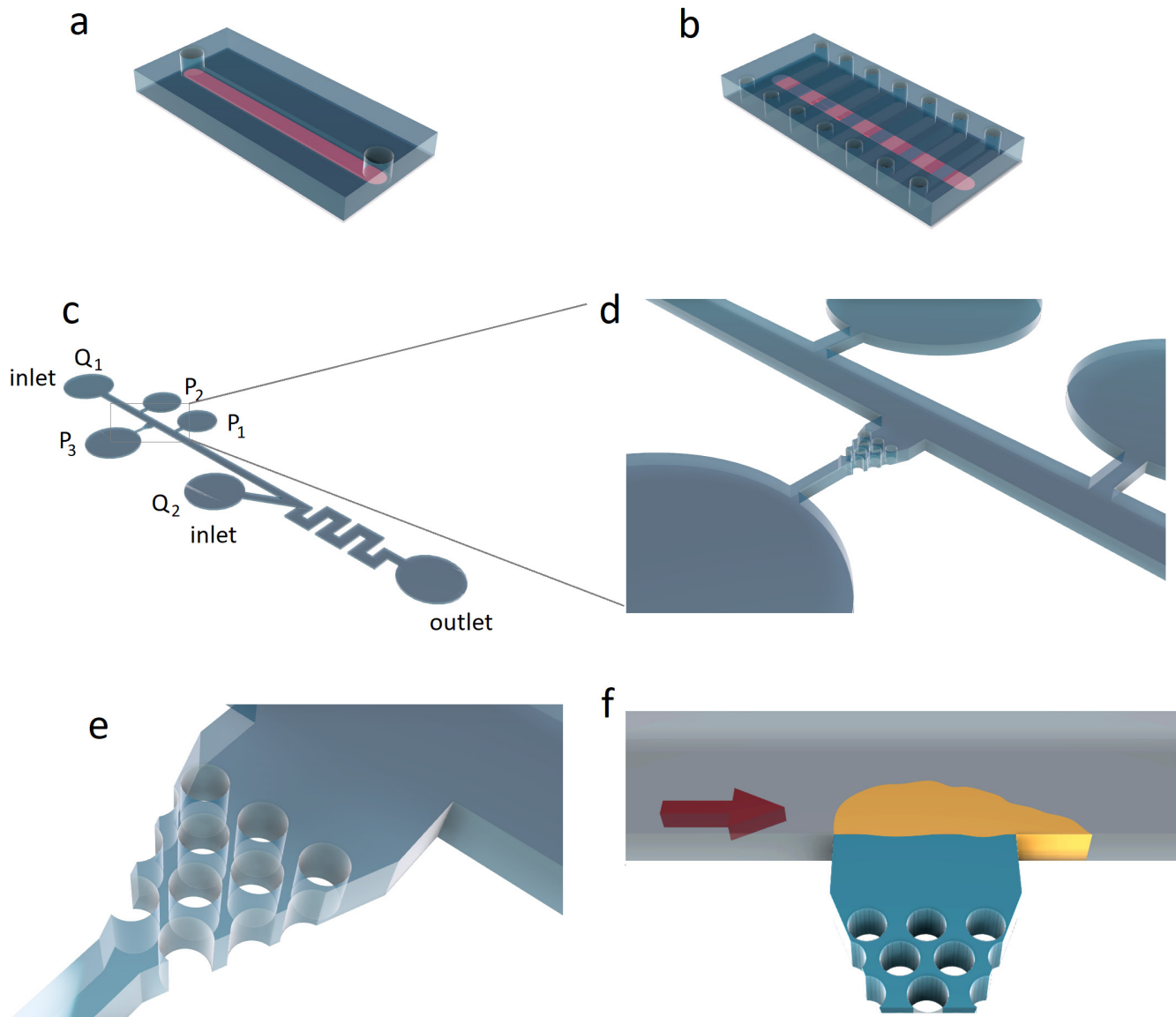


Рисунок 2. Микрофлюидные устройства для анализа формирования тромба под управляемым сдвигом. а) Лента коллагена размером 100 мкм (красная) была помещена и иммобилизована с микрофлюидным рисунком по длине предметного стекла. б) Микрофлюидное устройство с набором каналов было ориентировано перпендикулярно коллагеновому рисунку (красный). Адаптировано из [7]. с-е) Микрофлюидное устройство с регулируемым градиентом давления. Постоянный поток Q_1 обеспечивался шприцевым насосом. Наличие датчиков давления (P_1 , P_2 и P_3) и дополнительного втока Q_2 позволило контролировать градиент давления в зоне формирования тромба. (е, ф). ф) Тромб (оранжевый) сформирован на коллагене (синий), располагаясь между столбиками PDMS (белые круги). Адаптировано из [8].

при помощи микрофлюидного канала. Подобная методика предполагает вакуумное присоединение камеры из PDMS с единственным каналом, проходящим по всей длине предметного стекла (Рис. 2, а, б). Такой подход к созданию проточной камеры позволяет проводить эксперименты для различных пристеночных скоростей сдвига в пределах одной камеры с постоянной геометрией, регулировать область имитируемого повреждения, а также зафиксировать неизменными для серии экспериментов положение, размер и концентрацию активатора.

Использование проточных камер из PDMS также позволяет создавать проточные системы со сложной геометрией. Исследователи во главе

со Скоттом Л. Даймондом продемонстрировали применение разработанного ими микрофлюидного устройства, позволяющего прокачивать флуоресцентное растворенное вещество через растущий тромб, образующийся на коллагене ± тканевом факторе, при независимом контроле градиента давлений и скорости сдвига [8]. Микрофлюидное устройство также создавалось при помощи техники мягкой литографии и было закреплено на предметном стекле при помощи вакуумируемого контура. Геометрия устройства включает несколько входов и выходов, дополнительное сопротивление, а также домены для контроля и мониторинга давления (Рис. 2, с, ф). Подобная система позволяет варьировать большое количество степеней свободы

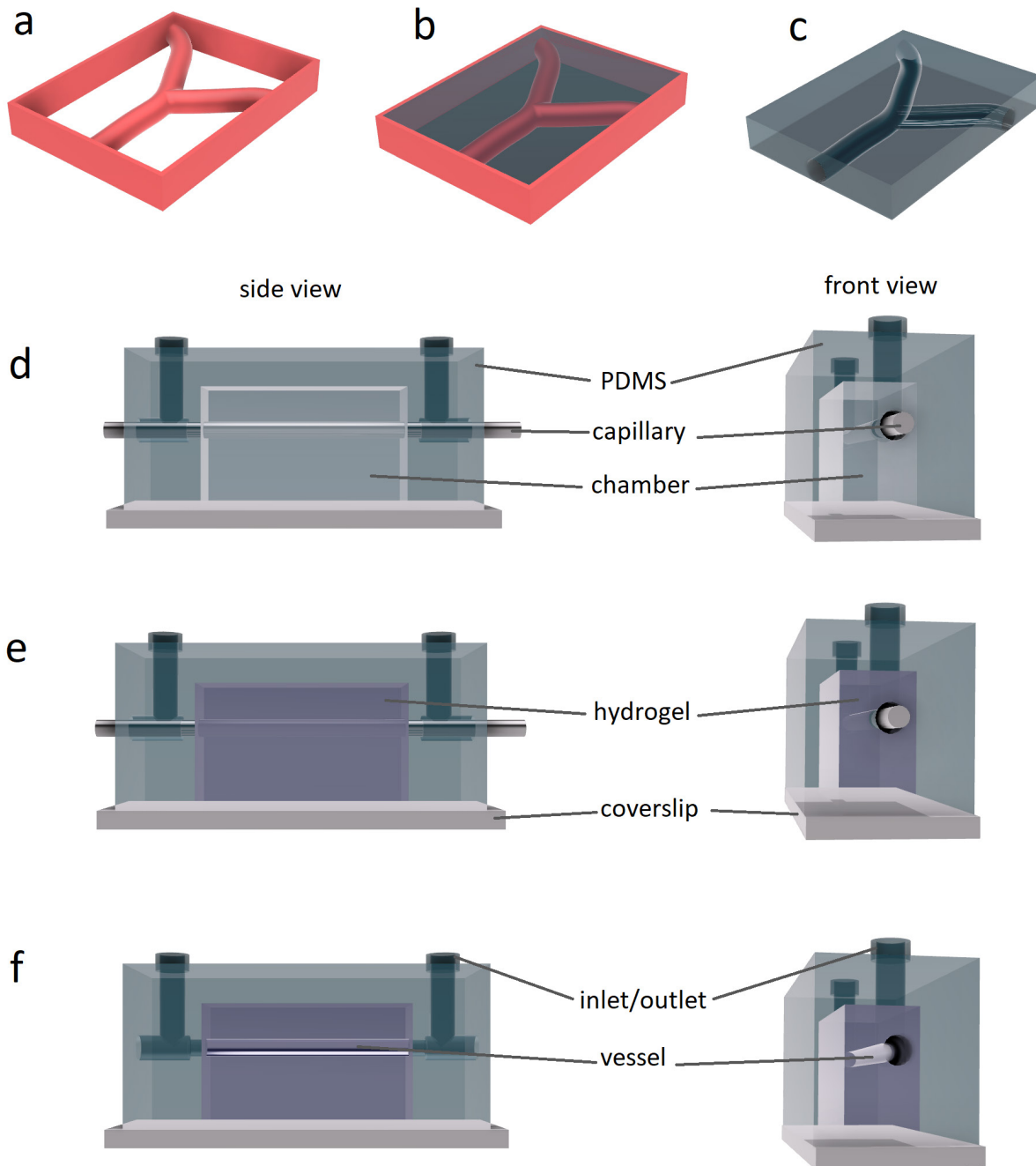


Рисунок 3. Разные подходы к использованию гидрогелей для имитации искусственных сосудов.) – с): биопечать васкуляризованных гидрогелей, схема процесса биопечати (адаптировано из [12]). а) биопечать сосудов и стенки; б) основа для GelMA; в) финальное блокирование GelMA после затвердевания под действием ультрафиолетового света и растворение дополнительного слоя (сделанного из плуроника). d) – f): 3D микрососуд, сделанный из ткани, схем процесса конструирования: d) PDMS форма, которая содержит отверстия для втока и вытока, прикреплена вакуумом к стеклу и выступает в роли оболочки. Цилиндрический стержень шаблона (например, стеклянный капилляр) расположен в середине камеры внутри специальных функциональных отверстий; е) PDMS форма заполнена гидрогелем в жидком состоянии; f) после желирования стержень физически удаляется, вытягивая его с одного конца. После удаления стержня шаблона камера готова к использованию для перфузии крови/плазмы или может использоваться для посадки и культивации эндотелиальных клеток. Адаптировано из [9].

модели, при этом точно фиксируя важные гемодинамические параметры — давление и скорость сдвига. Отличительной чертой данной системы была геометрия расположения активаторов и тромба по отношению к объективу микроскопа: в отличие от классических систем, в которых тромбообразование происходит на одной из горизонтальных плоскостей проточной системы, в данной модели рост тромба инициировался

на вертикальных стенках и распространялся в горизонтальной плоскости вглубь канала (Рис. 2, f), что позволяло исследователям наблюдать внутреннюю структуру тромба не делая оптические срезы, как в классических экспериментах.

Модели, основанные на использовании гидрогеля

Наиболее часто используемые подходы к

конструированию микрофлюидных камер удобны в использовании, но степень соответствия реальному сосуду достаточно низкая: нефизиологичная геометрия (прямоугольное/квадратное сечение каналов), отсутствие эндотелиальных клеток, механически жесткие стенки из PDMS. Наиболее реалистичные модели сосудов на сегодняшний день создаются на основе объединения технологии гидрогелей и методов культивирования клеток – такие системы все чаще используются для самых разных биомедицинских задач [9-11].

Ю Шрайк Чжан *et al.* использовали технологию 3D-биопечати для создания высокобиомиметической модели тромбоза [12]. Тело камеры было выполнено из гидрогеля - метакрилат-желатина (GelMA), на основе которого

были изготовлены три типа каналов: микроканалы, покрытые HUVEC без фибробластов; неэндотелиализированные микроканалы с инкапсулированными фибробластами в гидрогеле и эндотелиализированные микроканалы с одновременно инкапсулированными внутри фибробластами (Рис. 3, а, с). Таким образом, использование гидрогелей и технология биопечати позволяют получить модели сосудов с высокой степенью подобия реальным сосудам как с точки зрения механических свойств, так и по биохимическому составу клеточной стенки.

Другой популярный подход к дизайну реалистичного сосуда основан на технике удаления капилляров (Рис. 3, d-f) и успешно применяется для решения разнообразных задач [9].

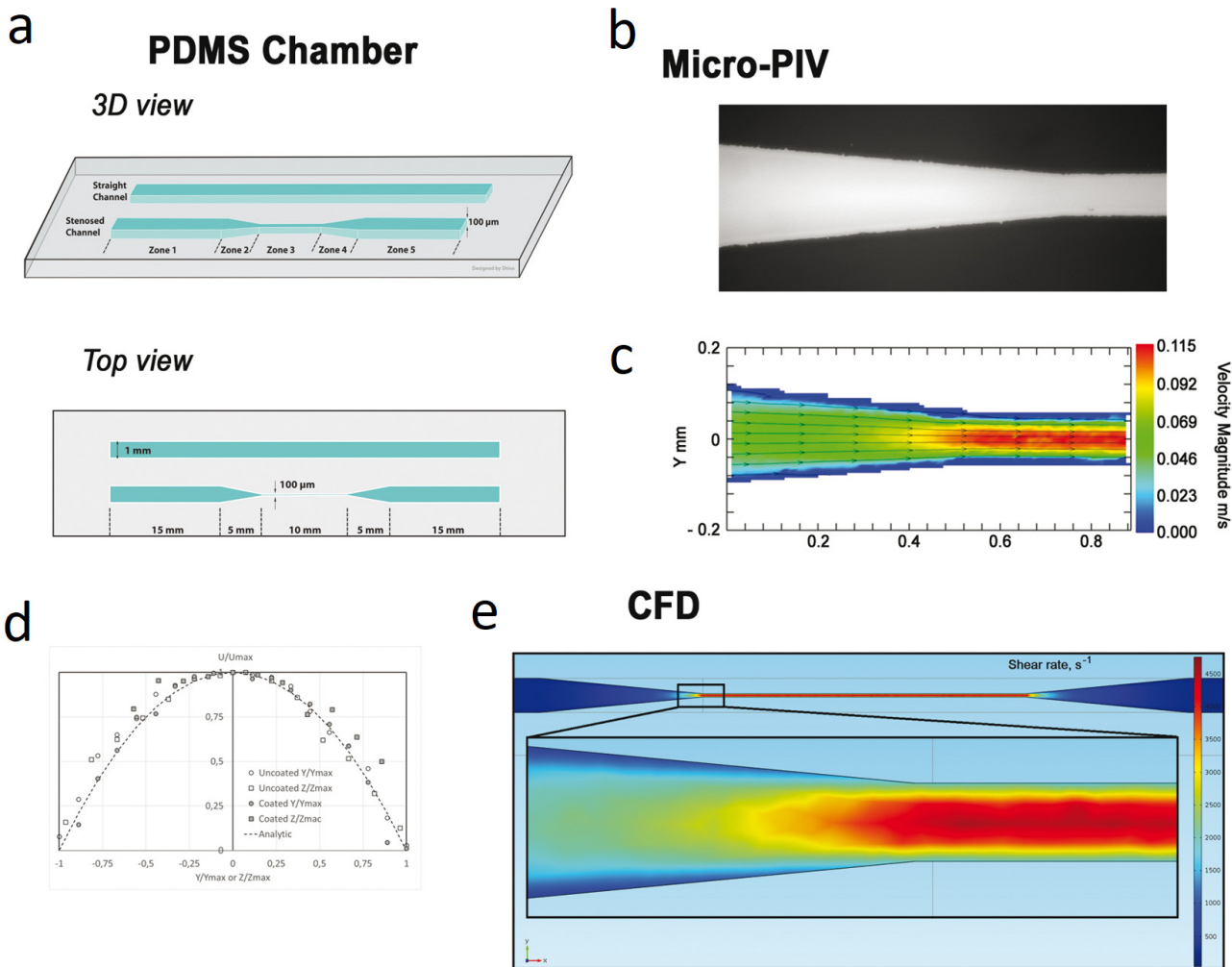


Рисунок 4. Схема микрофлюидной проточной камеры, разработанной для создания градиентов сдвига. (а) Схема полидиметилсилоксановой (PDMS) проточной камеры, содержащей прямоугольный канал шириной 1 мм и высотой 0,1 мм и стенозический канал с такими же измерениями, но уменьшенный на 90% по ширине в центральной области (зона 3). Зоны 1-5 обозначены в нижней части схем, показывающих 3D вид. (б) Микрофотография микрофлюидной проточной камеры с флуоресцентного микроскопа: переход от зоны 2 к зоне 3 стенозического канала. Изображение было получено с увеличением $\times 20$. (с) Карта величины скорости на средней высоте стенозического канала, полученная с использованием скоростной съемки микрокастиц: переход от зоны 2 к зоне 3. (д) Безразмерные профили скорости U/U_{max} или Z/Z_{max} (U – величина скорости, U_{max} – полуширина стеноза, Z_{max} – полувысота) на средней высоте и средней ширине микрофлюидной проточной камеры в зоне 3. (е) Вычислительный анализ гидродинамики, представляющий скорость сдвига в нижней части камеры ($z = 0$) по всей камере и в увеличенной области, соответствующий входу в зону 3. Геометрия канала в модели вычислительной гидродинамики (CFD) соответствовала стенозической версии камеры, показанная на панели (а). Рисунок адаптирован из [20].

Плоско-параллельные проточные камеры

Следует отметить, что проточные камеры плоскопараллельной геометрии несмотря на свою простоту активно и успешно используются для фундаментальных исследований системы гемостаза и сегодня [13-17]. Эти камеры сконструированы с использованием и технологии микрофлюидики, и более простых подходов (например, разрезав канал на липкой ленте, которую затем помещают между покровными стеклами или их аналогами).

Исследователи из Маастрихтского университета, используя стандартную проточную камеру с плоскопараллельной геометрией, продемонстрировали возможность бесклеточных гомогенатов из человеческих атеросклеротической бляшек способствовать адгезии тромбоцитов и образованию агрегатов в условиях относительно высоких скоростей сдвига (1000 с^{-1}) [18]. Данная работа позволила сравнить тромбогенный потенциал стандартных активаторов (в том числе фибриллярного коллагена первого типа) с многокомпонентной смесью из активаторов, выделяемой из атеросклеротических бляшек пациентов. Идея сравнения тромбообразования на различных активаторах и их комбинациях была в дальнейшем выведена авторами на новый уровень: при помощи технологии микропечати был проведен анализ тромбообразования на более чем 50 различных поверхностях [19] в стандартных камерах плоскопараллельной геометрии.

Модели со стенотической геометрией

Для изучения влияния эффекта резкого изменения потока на динамику тромбообразования используют проточные камеры с особой геометрией: в стандартную форму проточной камеры добавляется возмущение, влияющее на распределение скорости сдвига. Подобная геометрия позволяет изучать характер образования тромба при пространственном изменении скорости сдвига более чем на порядок.

Создание стенотической геометрии может быть реализовано также путем имитации атеросклеротической геометрии полуокружностью [20] или созданием локального возмущения, предназначенного для резкого увеличения скорости сдвига до 1800 с^{-1} в сочетании с немедленным замедлением сдвига до 200 с^{-1} [21]. Используя камеры, имитирующие стеноз, было показано, как градиенты скорости сдвига способствуют двухфазному образованию тромба на слабых адгезивных белках, таких как фибриноген, зависимым от фактора фон Виллебранда образом [22]. Конструкция стандартной плоскопараллельной проточной

камеры была модифицирована для возможности проводить сравнение двух каналов: прямого и стенозированного (уменьшение области просвета сосуда на 90%, Рис. 4).

Разное: помимо традиционных задач или техник

В ряде работ подходы микрофлюидики также успешно применялись для анализа процессов полимеризации фибрина в условиях потока, но в отсутствие тромбоцитов [23, 24].

В большинстве существующих моделей тромбоза поток в системе поддерживается постоянным за счет использования шприцевых насосов. Очевидно, условия постоянного потока не являются физиологически корректными, поэтому в ряде моделей исследователи используют специальные шунтирующие каналы, тем самым реализуя условия квазистационарного перепада давления [25, 26]. Постоянство скорости сдвига также не является корректным на малых временах порядка сердечного цикла: в артериях эффекты пульсаций могут быть существенными, поэтому в ряде моделей исследователи использовали специальные системы для создания эффекта пульсаций [27, 28].

Для обеспечения перфузии жидкости через камеру обычно используются либо шприцевые насосы, либо гидростатическое давление, однако

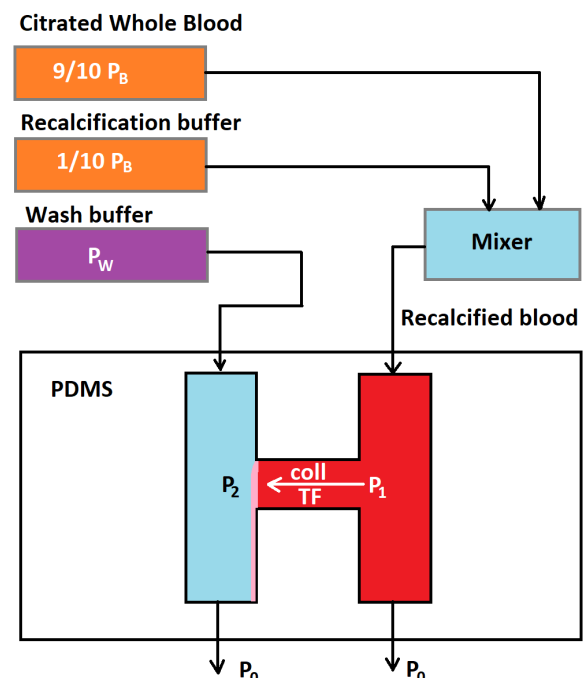


Рисунок 5. Схема микрофлюидной модели гемостаза с каналом повреждения. Цитратная цельная кровь и рекальцифицированный буфер были совмещены в объемном соотношении 9:1. Рекальцифицированная цельная кровь (красная) и буфер для отмывки (синий) были впрыснуты в два разных вертикальных канала устройства внесосудистого повреждения. Канал горизонтального повреждения (состоящий из коллагена и/или ТФ) соединяет два вертикальных канала. Адаптировано из [32].

недавно была предложена камера *ex vivo* с автоперфузией, предназначенная для изучения поведения лейкоцитов и тромбоцитов мышей в четко определенных гемодинамических условиях [29]. В этой модели сердце мыши непрерывно управляет потоком крови через камеру, обеспечивая широкий диапазон физиологических скоростей сдвига. Таким образом, камера *ex vivo* представляет собой внешний сосуд, соединяющий артериальную и венозную системы живой мыши, то есть сердце животного создает движущую силу кровообращения.

Изучение тромбообразования в условиях потока крови в большинстве случаев сфокусировано на исследовании процессов, которые могут происходить в случае непроницающего повреждения внутреннего слоя сосудистой стенки над атеросклеротической бляшкой и, таким образом, соответствует артериальному тромбозу. Другим патологическим сценарием тромбообразования является формирование так называемых красных венозных тромбов в области застойных зон вблизи венозных клапанов. Для моделирования этого процесса была предложена специальная микрофлюидная проточная камера, в которой за счет подбора геометрических и гемодинамических параметров формируется застойная зона, имитирующая ситуацию в живом организме [30].

На сегодняшний день *in vitro* модели тромбоза значительно чаще применяются в фундаментальных исследованиях, чем в клинической практике, что связано главным образом с проблемами стандартизации таких систем. Несмотря на это, в последние годы проточные камеры все чаще используются для диагностики и изучения нарушений в работе

системы гемостаза, а также для мониторинга антиагрегантной терапии [3-5, 31].

In vitro модели гемостаза

Одна из первых моделей гемостаза, описанных в литературе, была предложена исследователями из Университета Колорадо и создана на основе стандартных технологий микрофлюидики [32]. Оригинальное устройство было разработано в форме буквы «Н» (материальной основой является PDMS), где два внешних вертикальных канала представляют сосудистый и внесосудистый соответственно. Вертикальные каналы соединены горизонтальным каналом, имитирующим отверстие в стенке сосуда, которое называется каналом повреждения (Рис. 5). Фибриллярный коллаген I типа, рекомбинантный тканевый фактор человека или их комбинация адсорбировались на стенках данного канала. Таким образом, канал повреждения был покрыт компонентами, которые находятся в стенке сосудов и способствуют инициации гемостатического ответа в случае повреждения сосуда. Рекальцифицированная цельная кровь и буфер подавались через сосудистые и внесосудистые каналы соответственно. Перепады давления в цельной крови и буфере были отрегулированы таким образом, чтобы средняя пристеночная скорость сдвига стенки в кровяном канале составляла 2200 c^{-1} . Постоянная разница давления в канале, имитирующем повреждение сосуда, отражала перепад давления между сосудом и окружающими его тканями. Подавление функции тромбоцитов или коагуляции привело к увеличению времени закрытия канала повреждения или нестабильности формирующихся тромбов. Время закрытия канала повреждения при наличии

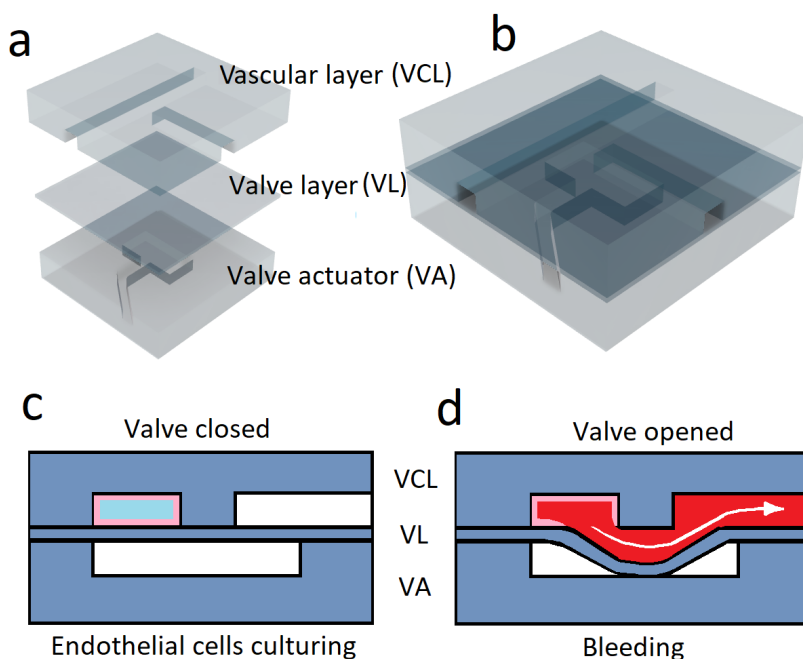


Рисунок 6. Многослойная микрофлюидная модель

кровотечения. (а) Три PDMS слоя: 1 – сосудистый слой, состоящий из сосудистого канала и канала кровотока, 2 – PDMS клапанный слой, 3 – слой, деформирующий клапан из-за уменьшения давления; (б) Схема объединенного устройства; (в) Общая схема системы: в-первых, эндотелиальные клетки (розовый) культивированы, формируя монослой в сосудистом канале (синий). (д) Затем, цельная кровь (красный) пропускается и клапанный слой перемещается из-за увеличения давления в камере привода клапана (белый). Кровь, пока клапан находится в открытой позиции, течет через сосудистый канал, а также через новый канал, симулируя кровотечение из-за проникающего повреждения. Адаптировано из [33].

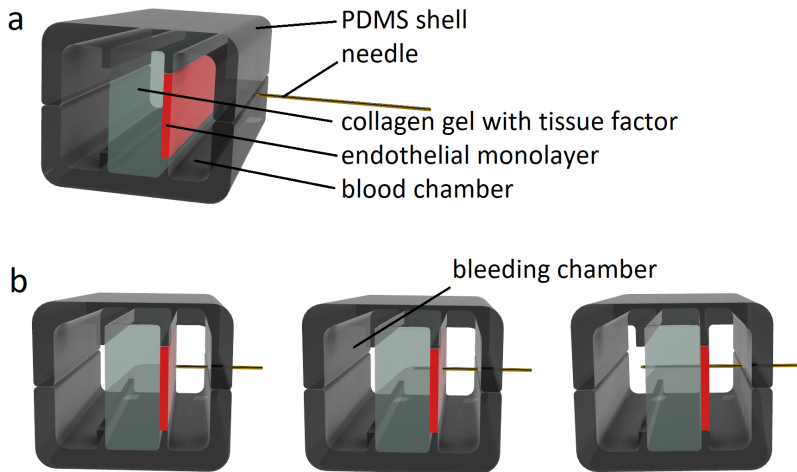


Рисунок 7. *In vitro* модель гемостаза в искусственном сосуде. а) Система инкапсулирована в оболочку из PDMS. Основные компоненты показаны на схеме и соответствующе обозначены. б) Последовательные шаги процесса протыкания совершаются иглой. Игла движется справа налево и сначала протыкает канал с кровью (правая часть), затем проникает через эндотелиальный слой (красный) и секцию с коллагеновым гелем (посередине) и, наконец, достигает «внесосудистую» область, обозначенную как камера кровотечения. Адаптировано из [34]

только коллагена составляло более 20 минут, при наличии только ТФ - $15,8 \pm 2$ минуты, а при одновременном их нанесении - $7,5 \pm 1,6$ минут. Разработанная система в виду своей технической простоты может быть использована в качестве интегрального теста гемостаза, позволяющего оценивать общее состояние данной системы и, возможно, выявлять высокие риски кровотечений или тромбозов.

Следующая из опубликованных моделей гемостаза была предложена командой Вилбура Лама. Помимо использования многослойной PDMS камеры исследователи включили в предложенную модель монослой эндотелиальных клеток. Повреждение данной системе моделируется за счет актуализации пневматического клапана, который резко изменяет геометрию системы и приводит к вытеканию крови в специальный канал (Рис. 6). Таким образом, разработанная комплексная модель кровотечения при механическом повреждении включает «эндотелиализированную» микрофлюидную систему в сочетании с микроскопическим пневматическим клапаном, который вызывает сосудистое «повреждение». [33] В процессе прокачки через систему цельной крови авторами визуализируется формирование гемостатической пробки и измеряется «время кровотечения *in vitro*». Таким образом, в качестве активаторов гемостатического ответа в данной модели выступают сами поврежденные эндотелиальные клетки, а также внеклеточные белки субэндотелиального матрикса, наработанные клетками в процессе культивации.

В недавней работе исследователей из университета Пенсильвании описывается новый подход к моделированию гемостаза *in vitro*, в котором стенка искусственного сосуда прокалывается иглой (Рис. 7), создавая тем самым канал, через который из-за перепада давления происходит утечка крови [34]. С помощью анализа микроскопических изображений авторы

представили количественные данные о динамике образования гемостатической пробки и закрытия места повреждения и продемонстрировали их качественное сходство с ситуациями *in vivo*. Модель включает PDMS-основу для формирования геля из коллагена, а также канала, имитирующего кровеносный сосуд (Рис. 7). Коллаген, смешанный с релипидированным ТФ полимеризуется в специальном сосуде, стенки которого образованы PDMS, а эндотелиальные клетки высевают непосредственно поверх коллагенового геля и культивируют для образования монослоя. Повреждение сосуда (с диаметром 1 мм) получается с помощью иглы (30G), а размеры повреждения (отверстия в геле) варьируются от 120 мкм до 200 мкм и определяются диаметром иглы (Рис. 7). Для изучения образования гемостатической пробки через внутрисосудистый канал прокачивали цельную человеческую кровь, рекальцифицированную в присутствии КТИ (ингибитора трипсина из кукурузы) при скорости сдвига 100 с^{-1} (что соответствует крупным венам в организме человека). Одновременное накопление тромбоцитов и фибрина в месте повреждения приводило к образованию гемостатических пробок, которые останавливали кровопотерю в течение 10 минут после травмы. Основные результаты данной работы показывают, что данная модель сосудистого повреждения представляет собой потенциально мощный инструмент для имитации и исследования внутренней работы гемостатического ответа. Сложность данной модели (связанная в первую очередь с использованием монослоя эндотелиальных клеток) затрудняет ее применение для решения клинических задач (оценки рисков тромбозов или кровотечений), но позволяет в будущем применять ее для исследования фундаментальных задач физиологии гемостаза, а также для доклинических исследований новых лекарственных препаратов.

Заключение

В развитии *in vitro* моделей тромбоза и гемостаза на сегодняшний день можно выделить следующие тенденции: модели, ставящие своей целью ответы на фундаментальные вопросы устройства гемостатического ответа демонстрируют тенденцию к учету все большего количества факторов и особенностей микроокружения, имеющих место в живом организме: механические свойства тканей (переход к гидрогелям), наличие как поврежденных/активированных эндотелиальных клеток, так и здорового эндотелия, учет особенностей гемодинамики (наличие стеноза канала в случае моделирования артериального тромбоза, пульсаций потока, а также шунтирующих сосудов) и так далее. С другой стороны, системы, которые находят все более широкое применение для решения клинических задач, в силу необходимости стандартизации остаются относительно простыми в плане технического устройства и реализации. Важной тенденцией последних лет также стало развитие моделей гемостаза, которым в данном образе уделяется отдельная секция. Создание новых реалистичных моделей гемостаза представляется нам крайне важной задачей, так как в перспективе позволит ответить на важнейшие фундаментальные вопросы в данной области исследований.

Финансирование

Работа была поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований грант 19-51-15004, и грантом эндаунмент фонда «Наука-детям». Эта работа также была выполнена при поддержке Программы Развития Междисциплинарной Научной и Образовательной Школой Московского Государственного Университета им М.В. Ломоносова «Фотонные и Квантовые Технологии. Цифровая медицина».

Список Литературы

1. Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine*. 2011 Nov;17(11):1423-36. <https://doi.org/10.1038/nm.2515>
2. Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007 Oct 1;27(10):2079-93. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.142810>
3. Brouns SL, van Geffen JP, Heemskerk JW. High-throughput measurement of human platelet aggregation under flow: application in hemostasis and beyond. *Platelets*. 2018 Oct

- 3;29(7):662-9. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1447660>
4. Neeves KB, Onasoga AA, Wufsus AR. The use of microfluidics in hemostasis: clinical diagnostics and biomimetic models of vascular injury. *Current opinion in hematology*. 2013 Sep 1;20(5):417-23. DOI: 10.1097/moh.0b013e3283642186
5. Mangin PH, Neeves KB, Lam WA, Cosemans JM, Korin N, Kerrigan SW, Pantelev MA, Subcommittee on Biorheology. In vitro flow-based assay: From simple toward more sophisticated models for mimicking hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2021 Feb;19(2):582-7. <https://doi.org/10.1111/jth.15143>
6. Nechipurenko DY, Shibeko AM, Sveshnikova AN, Pantelev MA. In silico hemostasis modeling and prediction. *Hämostaseologie*. 2020 Sep 11. DOI: 10.1055/a-1213-2117
7. Neeves KB, Maloney SF, Fong KP, Schmaier AA, Kahn ML, Brass LF, Diamond SL. Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2193–201. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03188.x>
8. Muthard, Ryan W., and Scott L. Diamond. “Side view thrombosis microfluidic device with controllable wall shear rate and transthrombus pressure gradient.” *Lab on a Chip* 13.10 (2013): 1883-1891. <https://doi.org/10.1039/C3LC41332B>
9. Bogorad MI, DeStefano J, Wong AD, Searson PC. Tissue-engineered 3D microvessel and capillary network models for the study of vascular phenomena. *Microcirculation*. 2017 Jul;24(5):e12360. DOI: 10.1111/micc.12360
10. Jamieson JJ, Searson PC, Gerecht S. Engineering the human blood-brain barrier in vitro. *Journal of biological engineering*. 2017 Dec;11(1):1-1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13896-7>
11. Xie R, Zheng W, Guan L, Ai Y, Liang Q. Engineering of hydrogel materials with perfusable microchannels for building vascularized tissues. *Small*. 2020 Apr;16(15):1902838. <https://doi.org/10.1002/sml.201902838>
12. Zhang Yu Shrike, Davoudi Farideh, Walch Philipp et al. Bioprinted thrombosis-on-a-chip // *Lab on a Chip*. — 2016. — Vol. 16, no. 21. — P. 4097–4105. <https://doi.org/10.1039/>

C6LC00380J

13. Ahmed MU, Kaneva V, Loyau S, Nechipurenko D, Receveur N, Le Bris M, Janus-Bell E, Didelot M, Rauch A, Susen S, Chakfé N. Pharmacological blockade of glycoprotein VI promotes thrombus disaggregation in the absence of thrombin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2020 Sep;40(9):2127-42. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314301>
14. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, Obydennyi SI, Eckly A, Léon C, Gachet C, Grishchuk EL. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2019 Jan;39(1):37-47. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>
15. DeCortin ME, Brass LF, Diamond SL. Core and shell platelets of a thrombus: A new microfluidic assay to study mechanics and biochemistry. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Oct;4(7):1158-66. <https://doi.org/10.1002/rth2.12405>
16. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, Eckly A, Receveur N, Nechipurenko DY, Obydennyi SI, Kireev II, Gachet C, Ataulakhanov FI, Mangin PH. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016 Sep 29;128(13):1745-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-696898>
17. Swieringa F, Baaten CC, Verdoold R, Mastenbroek TG, Rijnveld N, Van Der Laan KO, Breel EJ, Collins PW, Lancé MD, Henskens YM, Cosemans JM. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016 Apr;36(4):692-9. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306537>
18. Cosemans JM, Kuijpers MJ, Lecut C, Loubele ST, Heeneman S, Jandrot-Perrus M, Heemskerk JW. Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 2005 Jul 1;181(1):19-27. [10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.037](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.037)
19. De Witt SM, Swieringa F, Cavill R, Lamers MM, Van Kruchten R, Mastenbroek T, Baaten C, Coort S, Pugh N, Schulz A, Scharrer I. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nature communications*. 2014 Jul 16;5(1):1-3. <https://doi.org/10.1038/ncomms5257>
20. Westein, Erik, et al. "Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.4 (2013): 1357-1362. DOI: 10.1073/pnas.1209905110
21. Nesbitt, Warwick S., et al. "A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation." *Nature medicine* 15.6 (2009): 665-673. <https://doi.org/10.1038/nm.1955>
22. Receveur, Nicolas, Dmitry Nechipurenko, Yannick Knapp, Aleksandra Yakusheva, Eric Maurer, Cécile V. Denis, François Lanza, Mikhail Panteleev, Christian Gachet, and Pierre H. Mangin. "Shear rate gradients promote a bi-phasic thrombus formation on weak adhesive proteins, such as fibrinogen in a von Willebrand factor-dependent manner." *haematologica* 105, no. 10 (2020). <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.235754>
23. Neeves KB, Illing DA, Diamond SL. Thrombin flux and wall shear rate regulate fibrin fiber deposition state during polymerization under flow. *Biophysical journal*. 2010 Apr 7;98(7):1344-52. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.12.4275
24. Onasoga-Jarvis AA, Puls TJ, O'Brien SK, Kuang L, Liang HJ, Neeves KB. Thrombin generation and fibrin formation under flow on biomimetic tissue factor-rich surfaces. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014 Mar;12(3):373-82. <https://doi.org/10.1111/jth.12491>
25. Govindarajan V, Zhu S, Li R, Lu Y, Diamond SL, Reifman J, Mitrophanov AY. Impact of tissue factor localization on blood clot structure and resistance under venous shear. *Biophysical journal*. 2018 Feb 27;114(4):978-91. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.034>
26. Zilberman-Rudenko J, Sylman JL, Lakshmanan HH, McCarty OJ, Maddala J. Dynamics of blood flow and thrombus formation in a multi-bypass microfluidic ladder network. *Cellular and molecular bioengineering*. 2017 Feb 1;10(1):16-29. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0470-7>
27. Casa LD, Ku DN. High shear thrombus formation under pulsatile and steady

- flow. *Cardiovascular Engineering and Technology*. 2014 Jun;5(2):154-63. <https://doi.org/10.1007/s13239-014-0180-z>
28. Zhao XM, Wu YP, Cai HX, Wei R, Lisman T, Han JJ, Xia ZL, de Groot PG. The influence of the pulsatility of the blood flow on the extent of platelet adhesion. *Thrombosis research*. 2008 Jan 1;121(6):821-5. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.07.013>
29. Hafezi-Moghadam, Ali, Kennard L. Thomas, and Christian Cornelissen. "A novel mouse-driven ex vivo flow chamber for the study of leukocyte and platelet function." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286.4 (2004): C876-C892. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00500.2003>
30. Lehmann M, Schoeman RM, Krohl PJ, Wallbank AM, Samaniuk JR, Jandrot-Perrus M, Neeves KB. Platelets drive thrombus propagation in a hematocrit and glycoprotein VI-dependent manner in an in vitro venous thrombosis model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018 May;38(5):1052-62. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310731>
31. Caruso C, Lam WA. Point-of-Care Diagnostic Assays and Novel Preclinical Technologies for Hemostasis and Thrombosis. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2021 Mar* (Vol. 47, No. 02, pp. 120-128). Thieme Medical Publishers, Inc. DOI: 10.1055/s-0041-1723798
32. Schoeman, R. M., Rana, K., Danes, N., Lehmann, M., Di Paola, J. A., Fogelson, A. L., ... & Neeves, K. B. (2017). A microfluidic model of hemostasis sensitive to platelet function and coagulation. *Cellular and molecular bioengineering*, 10(1), 3-15. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0469-0>
33. Sakurai, Y., Hardy, E. T., Ahn, B., Tran, R., Fay, M. E., Ciciliano, J. C., ... & Lam, W. A. (2018). A microengineered vascularized bleeding model that integrates the principal components of hemostasis. *Nature communications*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02990-x>
34. Poventud-Fuentes, I., Kwon, K. W., Seo, J., Tomaiuolo, M., Stalker, T. J., Brass, L. F., & Huh, D. (2021). A Human Vascular Injury-on-a-Chip Model of Hemostasis. *Small*, 17(15), 2004889. <https://doi.org/10.1002/sml.202004889>

Подходы к визуализации динамики микротрубочек *in vitro*

Анисимов М.Н.^{1#}

1. Физический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Автор для переписки: amih199898@gmail.com

Аннотация

Тубулиновые микротрубочки внутри клетки выполняют множество различных функций благодаря своим уникальным свойствам. Динамическая нестабильность, т.е. спонтанное переключение между фазами полимеризации и деполимеризации, вместе с особыми механическими свойствами делает их непохожими на другие элементы цитоскелета. Больше 30-ти лет решаются разнообразные биофизические задачи, связанные с тем, какой механизм лежит в основе тех или иных свойств микротрубочек. Благодаря развитию световой микроскопии, в том числе, методов, позволяющих улучшить контраст биологических образцов, сделаны многочисленные открытия в данной области. Многие из них не только проливают свет на природу динамической нестабильности, но и на механизмы её регуляции различными молекулами. Одни из наиболее новых экспериментальных данных позволяют сделать вывод о наличии динамического поведения самого тела микротрубочки. В этой связи флуоресцентная и атомно-силовая микроскопия во многом незаменимы. В то же время, различные методы нефлуоресцентной микроскопии, в том числе, их современные реализации в виде микроскопии сверхразрешения, позволяют взглянуть на динамику микротрубочек на новом, субнанометровом уровне.

Ключевые слова: микротрубочки, световая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, динамическая нестабильность, тубулин, ассоциированные белки

Введение

Внутриклеточные микротрубочки сочетают в себе уникальные свойства, что делает их непохожими на другие элементы цитоскелета и позволяет им выполнять множество различных функций внутри клетки. Белок тубулин, полимеризуясь, образует жесткие структуры в виде полых цилиндров — микротрубочек,

обладающих большой жесткостью и динамичностью. Механические свойства этих полимеров гармонично сочетаются с их способностью спонтанно переключаться между фазами полимеризации и деполимеризации, что называется динамической нестабильностью [1]. Переключения с полимеризации (сборки) на деполимеризацию (разборку) называются «катастрофами», обратные переключения — «спасениями». Микротрубочки участвуют в поддержании формы клетки, обеспечивают её подвижность; они играют важную роль во внутриклеточном транспорте и в клеточном делении. Особенности внутренней организации микротрубочек и взаимодействия димеров тубулина друг с другом позволяют микротрубочкам развивать силы, необходимые в процессе распределения хромосом во время деления клетки [2-4].

Микротрубочки имеют диаметр порядка 25 нм, состоят из димеров тубулина, нековалентно связанных друг с другом продольными и поперечными контактами. Толщина микротрубочки значительно меньше разрешающей способности световой микроскопии, в то время как её длина может сильно меняться и способна достигать многих микрометров. Тем не менее, современные методы световой микроскопии позволяют наблюдать за поведением отдельных микротрубочек и даже способны дать некоторые представления о самой их структуре.

Большой интерес к тубулиновым микротрубочкам вызван их жизненно важными функциями, среди которых распределение хромосом во время деления клетки занимает особое место. С этим связан тот факт, что одни из самых успешно применяемых в химиотерапии противоопухолевых препаратов подавляют динамическую нестабильность микротрубочек за счёт ингибирования белка тубулина [5]. Тем не менее, механизмы действия таких веществ в большинстве случаев изучены плохо. Кроме того, внутриклеточная среда биохимически очень сложна, в ней присутствуют, в том числе, разнообразные регуляторные белки,

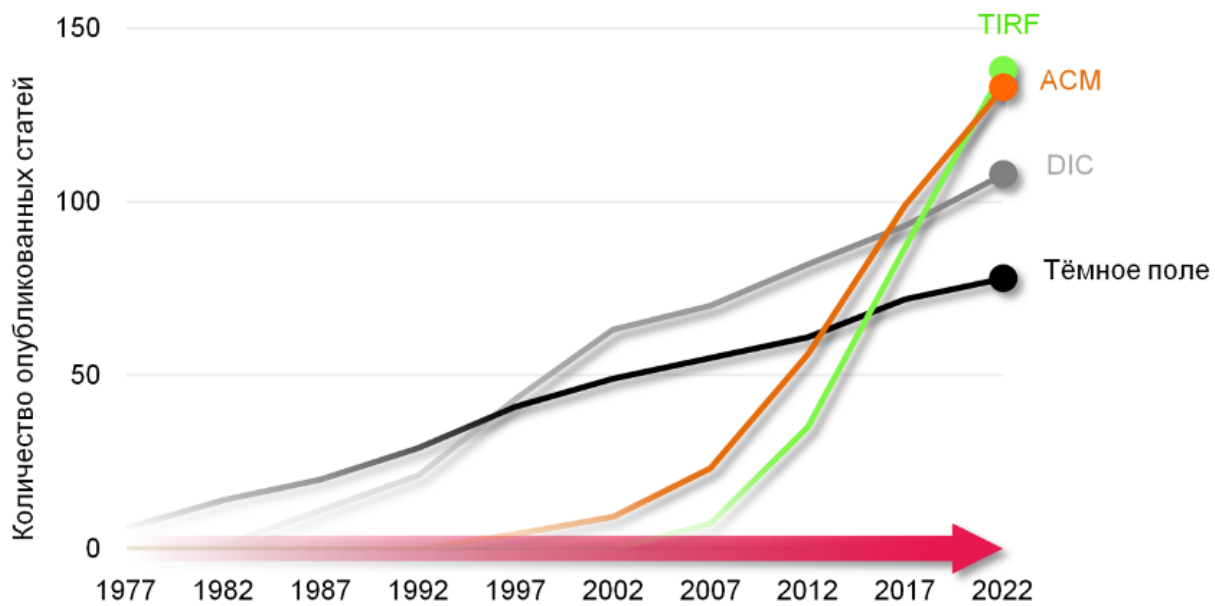


Рисунок 1. Количество работ, посвященных (или затрагивающих) изучение микротрубочек с помощью основных методов световой и атомно-силовой микроскопии, опубликованных к определённому моменту с 1977 по 2022 год. Сумма статей считалась с окном в 5 лет с помощью базы данных PubMed по запросам, включающим слова «microtubules» и название соответствующего метода микроскопии (флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения, «TIRF» (от англ. total internal reflection fluorescence), атомно-силовая микроскопия «АСМ», дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия («ДИК» или «DIC»), микроскопия тёмного поля или «dark-field»).

ассоциированные с микротрубочками, механизмы действия которых также не до конца понятны. Проведение эксперимента в искусственно воссозданных условиях с очищенным тубулином, а также при добавлении интересующих регуляторных молекул, позволяет упростить изучаемую систему и наиболее детально охарактеризовать поведение микротрубочек.

Микротрубочки изучаются более 50 лет с использованием различных методов. В 1963 году Слоттербек, Ледбеттер и Портер с помощью крио-электронной микроскопии дали полное описание тубулиновым полимерам, признали их повсеместность и назвали их «микротрубочками» [6]. Рентгеноструктурный анализ и приблизившаяся к нему по разрешающей способности криоэлектронная микроскопия позволили в дальнейшем изучить строение отдельных молекул тубулина и их взаимодействие в составе микротрубочек на атомарном уровне [7-8]. Параллельно с этими исследованиями, совершенствование световой микроскопии и развитие новых методов контрастирования позволили наблюдать за поведением микротрубочек *in vitro* и *in vivo* с впечатляющим нанометровым разрешением.

Данный обзор посвящен основным методам микроскопии микротрубочек *in vitro* в контексте

задач, которые решались в конкретных работах. Наблюдение за поведением микротрубочек и изучение их свойств в наиболее естественных условиях или, по крайней мере, приближенных к ним условиях *in vitro* эксперимента возможно с помощью, по крайней мере, двухразных физических подходов: световой и атомно-силовой микроскопий (АСМ). Эти подходы дают возможность взглянуть на микротрубочки на разных пространственных и временных масштабах. Сопоставить явления на этих масштабах необходимо для понимания механизмов динамического поведения тубулиновых полимеров. В течение последних более, чем 30 лет активных исследований динамической нестабильности микротрубочек, наиболее широко применялись различные методы световой микроскопии (Рис. 1). При этом в области изучения динамики тела микротрубочек, то есть её участка между двумя концами, атомно-силовая микроскопия начинает также активно использоваться наряду со световой микроскопией (Рис. 1). Поэтому в конце обзора мы рассмотрим оба подхода применительно к данной области исследований.

Надеюсь, что этот обзор окажется полезным для будущих исследований поведения микротрубочек и их свойств, обоснованного выбора метода микроскопии микротрубочек в различных экспериментальных постановках *in*

vitro, в том числе, с использованием регуляторных молекул.

Световая микроскопия отдельных микротрубочек

Микротрубочки можно визуализировать множеством оптических методов, включая светлопольную, поляризационную микроскопию, флуоресцентную и другие [9-11]. Однако в случае микроскопии светлого поля (Рис. 2 А) наибольший фоновый вклад возникает от самого поля освещения, что приводит к необходимости усреднения большого числа кадров одного и того же поля по времени для получения контрастного изображения микротрубочек, что несовместимо с изучением их динамической нестабильности. В таких исследованиях исторически важным было установление и подробный анализ фаз относительно медленной полимеризации и быстрой деполимеризации, сменяющих друг друга стохастическим образом [1; 12].

Метод тёмного поля

Одним из наиболее простых способов улучшения контраста изображения биологического образца, получаемого с помощью световой микроскопии, основан на детектировании рассеянного на образце света за счет отделения его от сигнала фона, в чем заключается микроскопия тёмного поля (Рис. 2 Б). В работе [13] была продемонстрирована

техническая возможность наблюдения отдельных микротрубочек с помощью темнопольной микроскопии и описана их прямая форма. Затем, 10 лет спустя, на основе этого метода впервые изучена динамическая нестабильность отдельных микротрубочек в системе с очищенным тубулином [12; 14]. После этого ключевого события в области изучения микротрубочек механизмы динамической нестабильности стали объектом всестороннего внимания со стороны биофизиков. Так, в работе [15] с помощью метода темного поля было установлено различие в динамике «плюс» и «минус» концов микротрубочек после того, как происходит отрезание их концевого участка, обогащённого ГТФ-связанными димерами тубулина (так называемой ГТФ-шапки), который, как считается, стабилизирует микротрубочку. Причем эти различия не связаны с типом затравок (то есть коротких стабильных фрагментов микротрубочек) для нуклеации микротрубочек и не зависят от того, какой способ — механический или фоторазрушающий — используется в эксперименте. Как пишут авторы, использование метода темного поля было обосновано необходимостью увеличения разрешения по глубине резкости, чтобы упростить визуализацию свободно колеблющихся концов микротрубочки.

Первые работы по описанию механических свойств микротрубочек так же были проведены с использованием темнопольной микроскопии.

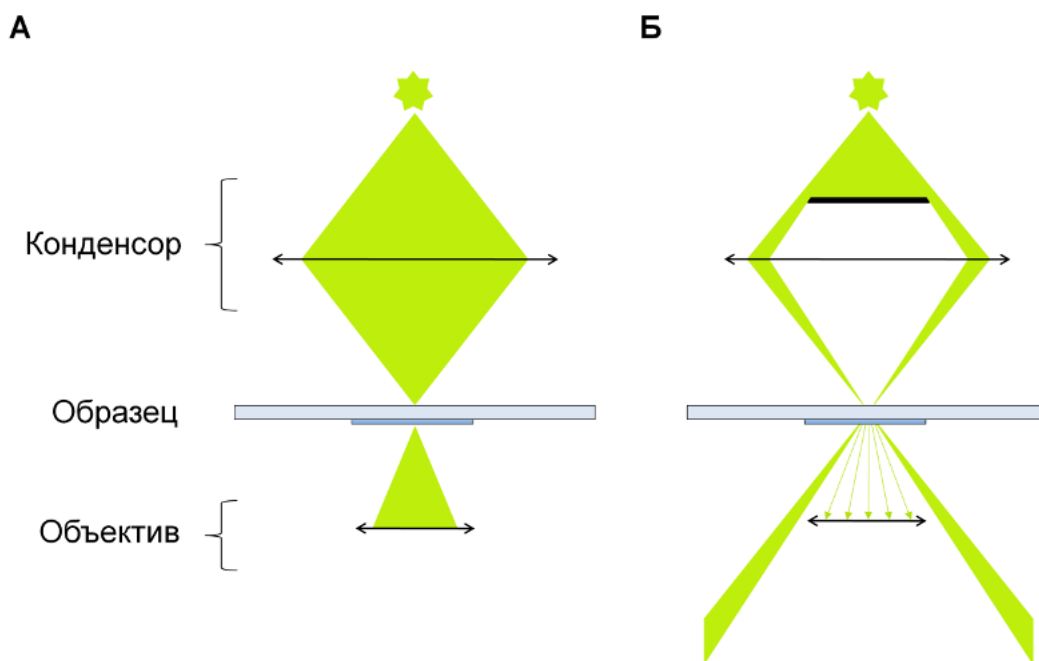


Рисунок 2. Схема работы светлопольного и темнопольного микроскопа. А) Образец освещается с помощью источника через конденсор. Проходящий через образец свет частично им поглощается и рассеивается, на основе чего формируется изображение с помощью объектива. Б) Световой фронт от источника при прохождении через конденсор преобразуется установленным в него непрозрачным диском или затемнённой областью таким образом, что после попадания на образец он не может попасть в объектив напрямую. Вместо этого объектив детектирует сигнал, соответствующий рассеянному от образца свету.

В статье [16] было сфотографировано большое количество микротрубочек, произвольным образом иммобилизованных на поверхности покровного стекла, после чего измерены их контурные длины и расстояния между плюс и минус концами. На основе этих измерений и их интерпретации с помощью физической модели сделано заключение о том, что тело микротрубочки на порядок более устойчиво к изгибу и менее — к растяжению, по сравнению с нитью F-актина. В более поздней работе [17] жесткость микротрубочек при изгибе измеряли с использованием метода лазерного пинцета, для чего один конец микротрубочки был химически связан со стеклянной микросферой, в то время как другой её конец был связан с подложкой из кварцевого стекла. Захват микросферы лазером и манипулирование ею позволил вызвать три различных способа деформации микротрубочки (изгиб перпендикулярно оси микротрубочки, сжатие вдоль оси микротрубочки в режимах, когда сжимающая сила меньше критической нагрузки или больше неё). Эта работа, тем самым, показала возможность эффективной комбинации тёмнопольной микроскопии и лазерной микроманипуляции для исследования механических свойств в субмикрометровом масштабе.

Оригинальный пример изучения микротрубочек включает исследование их электростатических свойств, которые играют важную роль в во взаимодействии с ассоциированными с ними белками [18]. Для этого авторы наблюдали за ориентацией микротрубочек в электрическом поле с помощью тёмнопольной микроскопии и описали их полиэлектролитную природу. Этот факт, в свою очередь, может объяснить физико-химическую основу неспецифических электростатических взаимодействий между микротрубочками и различными ассоциированными с ними белками.

Одна из первых работ, где изучалась динамическая нестабильность в присутствии регуляторных белков [19] основывалась на протоколе из статьи [12]. Благодаря такому исследованию было выяснено, что неочищенные белки, ассоциированные с микротрубочками и, в частности, так называемый белок MAP2 вызывают повторные спасения микротрубочек. В том же году был исследован другой регуляторный т-белок, который был одним из первых обнаруженных белков, ассоциированных с микротрубочками и охарактеризованных биохимически. Интерес к нему был значительно усилен открытием того факта, что т-белок является основным компонентом парных спиральных нитей при болезни Альцгеймера и что патологический вариант т-белка аномально фосфорилирован.

В статье [20] исследовался вопрос о том, как домены этого белка влияют на его взаимодействие с микротрубочками. Различные конструкции т-белка, отличающиеся составом доменов, были исследованы на предмет их взаимодействия с микротрубочками несколькими независимыми методами, среди которых тёмнопольная микроскопия использовалась для изучения образующихся пучков микротрубочек.

В настоящее время метод темного поля продолжает использоваться, но применяется реже, чем альтернативные методы (Рис. 1), вероятно, поскольку требует повышенной чистоты приготовления образцов для визуализации микротрубочек. Это связано с тем, что метод темного поля позволяет детектировать рассеяние даже от небольших посторонних загрязняющих поле зрения объектов, таких как агрегаты белков, потому что контраст изображения данных объектов квадратично возрастает в зависимости от их размеров. Тем не менее, успешное изучение динамики микротрубочек *in vitro* с помощью тёмнопольной микроскопии можно реализовать, например, по протоколу из недавней работы [21].

Метод дифференциально интерференционного контраста

Второй принцип улучшения контраста биологических образцов при их световой микроскопии основан на детектировании интерференционной составляющей результирующего сигнала. Дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия (DIC) вместе с интерференционной микроскопией отражённого света (IRM) основаны на этом принципе.

Реализация метода DIC включает использование двух линейно поляризованных в ортогональных направлениях лучей, опорного и вспомогательного, пространственно сдвинутых друг относительно друга на небольшое расстояние, обычно несколько меньшее, чем радиус диска Эйри. Для этого используются специальные призмы (Волластона, Номарского), которые, как показано на Рис. 3, располагаются в оптической схеме после поляризатора и перед анализатором.

После изобретения DIC-микроскопии как таковой, важным событием для всех последующих исследований микротрубочек была разработка метода, позволяющего получить улучшенное изображение образцов с помощью оптимизаций, предложенных независимо друг от друга двумя командами Роберта Аллена и Шинья Иноуэ [22-24]. Эти оптимизации затрагивали как саму оптическую схему, так и обработку изображения для получения изображения микротрубочек

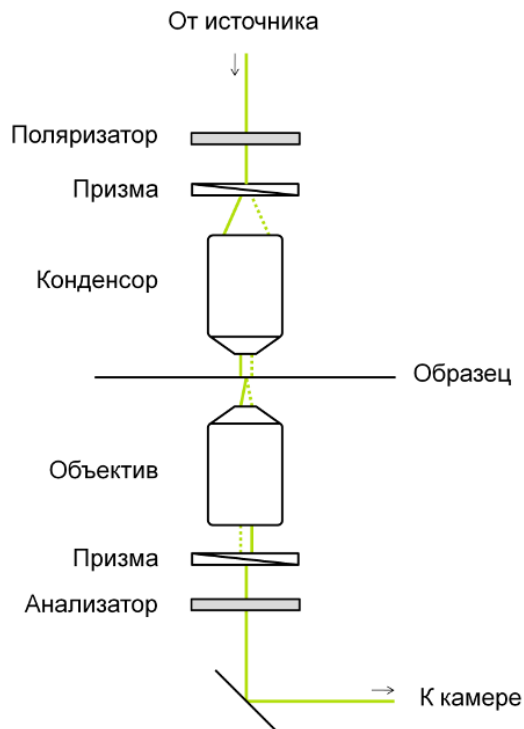


Рисунок 3. Схема работы DIC-микроскопа. Луч света от источника сначала проходит через поляризатор и становится линейно поляризованным. Затем, после прохождения через специальную призму (Волластона или Номарского), этот луч расщепляется на два параллельных луча, имеющих ортогональные направления поляризации. Детектирование гетерогенности оптической плотности образца осуществляется за счет того, что прошедшие через него в разных точках лучи приобретают относительную задержку фазы. Затем, после прохождения через вторую призму, лучи интерферируют друг с другом и приобретают, в общем случае, эллиптическую поляризацию. Стоящий за этой призмой анализатор снова преобразует луч в линейно поляризованный. Однако теперь его интенсивность зависит от взаимной ориентации поляризатора и анализатора, а так же от гетерогенности оптической плотности образца в точках, через которые прошли лучи.

с высоким контрастом, что не могло быть достигнуто при наблюдении их через окуляр [25], как, например, в случае тёмнопольной микроскопии. Параметры динамической нестабильности микротрубочек (скорости полимеризации, деполимеризации, частоты катастроф и спасений) были впервые подробно охарактеризованы в работе [26] с использованием DIC микроскопии. В следующей работе группы Салмона [27] впервые была проверена гипотеза о том, что исчезновение ГТФ-шапки на конце микротрубочки должно привести к её быстрой деполимеризации. Для этого авторы использовали DIC микроскопию, которая позволила в реальном времени наблюдать за отрезанием плюс-концевых участков микротрубочек с помощью ультрафиолетового луча. Призма Волластона, используемая авторами, пропускала достаточное количество ультрафиолетового излучения для того, чтобы можно было реализовать эту процедуру при трёхсекундной экспозиции. Тем не менее, в аналогичных экспериментах с минус-

концами микротрубочек не наблюдалась их быстрая деполимеризация. Наоборот, минус-конец продолжал расти с обычной скоростью после воздействия на него ультрафиолетом. Тем самым, эти фундаментальные работы не только охарактеризовали динамическое поведение микротрубочек, но и продемонстрировали различие в динамической нестабильности плюс- и минус-концов микротрубочки. Позднее, в работе [15] было показано, что отличие в поведении обоих концов микротрубочки не связано с артефактами использования ультрафиолетового излучения для отрезания её концевых участков. В данном случае механический элемент, осуществляющий отрезание, так же визуализировался с помощью DIC микроскопии, и, ожидаемо, создавал сильную засветку, которую, тем не менее, удалось минимизировать в направлении тела микротрубочки за счет соответствующей ориентации видеокамеры.

Изучение микротрубочек из растительного тубулина с помощью DIC микроскопии в работе [28] позволило выяснить, что они более динамичны по сравнению с микротрубочками животных. Это проявляется в большей частоте катастроф и отсутствии спасений при одинаковой скорости роста.

Затем начали появляться работы с использованием DIC микроскопии, в которых изучалась не только природа динамической нестабильности микротрубочек, но и механизмы её регуляции. К тому времени уже было известно, что параметры динамической нестабильности микротрубочек внутри клеток сильно отличаются от тех, что наблюдаются в системе с очищенным тубулином. Пролить свет на этот феномен смогли *in vitro* эксперименты, в которых изучалось влияние отдельных факторов на динамическую нестабильность. Одна из первых таких работ [29] позволила установить эффекты ионов магния на динамическую нестабильность микротрубочек. Измерение скоростей деполимеризации, вызванной холодом или ионами кальция, было произведено в работе [30] в рамках изучения структурных изменений белка тубулина в результате гидролиза ГТФ в его составе.

В клетке одними из основных регуляторов динамики микротрубочек являются ассоциированные с ними белки. Например, белок даблкортин, нарушения в работе которого приводят к некоторым заболеваниям мозга, был изучен в работе [31]. Авторы показали способность этого белка взаимодействовать с микротрубочками, стабилизировать их и приводить к образованию из них пучков *in vitro*. В работе [32] обнаружена удивительная способность белка XMAP215 из экстракта яиц *Xenopus* значительно увеличивать

скорость полимеризации и деполимеризации плюс-концов микротрубочек, а так же подавлять их спасения, что резко отличалось от эффектов воздействия остальных изученных к тому времени ассоциированных белков. Гомолог XMAP215/Dis1, найденный в почкующихся дрожжах, способствует сборке микротрубочек, увеличивая скорость их роста и уменьшая частоту катастроф [33]. Примечательно, что авторы исследовали взаимодействие белка Stu2 не только с микротрубочками, состоящими из свиного тубулина, но и из тубулина самих почкующихся дрожжей. Так как выход такого тубулина в процессе очистки был небольшим, авторы использовали DIC микроскопию вместо флуоресцентной.

Комбинация двух различных белков, включающая стабилизирующий белок XMAP215 и дестабилизирующий микротрубочки кинезин (ХКСМ1) вместе с очищенным тубулином позволили воссоздать основные особенности физиологической динамики микротрубочек (более быструю полимеризацию и более частые катастрофы и спасения), наблюдение чего было проведено с помощью DIC микроскопии [34]. Это был один из первых крупных шагов к пониманию сложных внутриклеточных процессов, зависящих от динамики микротрубочек, включающих, в том числе, сегрегацию хромосом.

Важная работа по изучению механических свойств микротрубочек [35] позволила с помощью DIC микроскопии и совмещённой с ней системы оптической ловушки измерить жесткость микротрубочек. Авторы сравнили результаты для микротрубочек, стабилизированных с помощью ингибитора динамики микротрубочек вещества таксол или медленно гидролизуемого аналога ГТФ — гуанозин-5'-[(α,β)-метилено] трифосфата (GMPCPP). Оказалось, что GMPCPP-микротрубочки примерно в 4 раза более жесткие. Эти результаты согласуются с аналогичными измерениями, проведёнными с помощью атомно-силовой микроскопии (ниже).

Интерференционная микроскопия отраженного света

Данный метод микроскопии, также известный под аббревиатурой IRM (от англ.: interference reflection microscopy), был изобретен в 1960-х годах [36]. Изначально применяемый для измерения небольшого расстояния между двумя плоскими поверхностями стеклянной подложки и для наблюдения нижней стороны прикрепленных к подложке клеток, сейчас он активно используется, в том числе, для изучения динамики микротрубочек. В настоящее время в некоторых работах название IRM используется

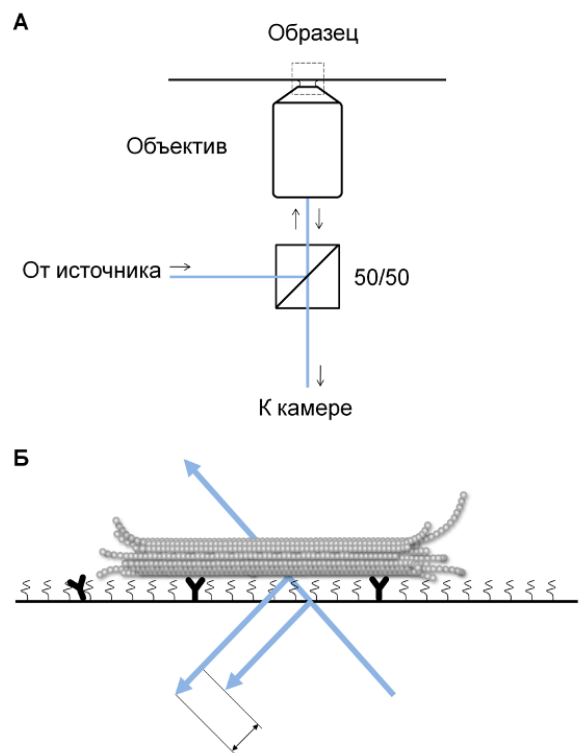


Рисунок 4. Схема работы микроскопии отражённого света (IRM) [39]. А) Оптическая схема, включающая источник света и полупрозрачное зеркало (50/50), установленное вместо дихроического. Б) Такая схема позволяет освещать образец через объектив и, одновременно, детектировать сигнал интерференции между лучами, отраженным от границы раздела стекло-среда и границы раздела среда-образец. Образец схематически представлен микротрубочкой, прикреплённой к заблокированной поверхности покровного стекла через антитела.

как синоним современным оптимизированным методам, объединённым аббревиатурой RICM (отражательная интерференционно-контрастная микроскопия) [37-38]. В IRM изображение формируется за счет интерференции между светом, отраженным от границы раздела стекло-среда, и светом, отраженным от границы раздела среда-образец (Рис. 4).

Простой и относительно дешевый способ реализации IRM микроскопии подразумевает включение 50/50 зеркала вместо дихроического во флуоресцентный микроскоп, и, при соответствующих настройках микроскопа, такая система позволяет получить изображение с отношением сигнал/шум, аналогичным DIC и флуоресцентной микроскопии (Рис. 4) [39-40]. Кроме того, на основе этого подхода можно легко реализовать одновременное наблюдение отдельных молекул, взаимодействующих с микротрубочкой, с помощью флуоресцентной микроскопии [41]. Этот метод был применён той же группой в работах [42] и [43]. Статья [42] посвящена изучению парадокса, связанного с активностью рассекающие микротрубочки ферментов — спастина, катанина, фитжетина. Этот парадокс заключается в том, что ингибирование этих ферментов *in vivo* фактически уменьшает, а не

увеличивает количество микротрубочек, что можно было бы ожидать на основании их способности разрушать микротрубочки. С помощью IRM авторы смогли установить выраженную способность стапина стабилизировать микротрубочки за счёт уменьшения скорости деполимеризации и увеличения частоты спасений.

Другие научные группы тоже начинают использовать IRM микроскопию по протоколу из работы [39]. В статье [44] для изучения способности отдельных молекул кинезина вызывать деполимеризацию микротрубочек был сделан выбор в пользу IRM из-за необходимости проведения длительных записей процесса медленной деполимеризации микротрубочек, стабилизированных с помощью GMPCPP. В работе [45] с помощью IRM изучались эффекты С-концевого хвоста α -мономера тубулина на динамику микротрубочки, а в работе [46] IRM позволила добиться высокого временного разрешения (10 кадров/с) и отношения сигнал к шуму на протяжении длительного времени съёмки благодаря отсутствию флуоресцентных красителей. Это было важно для изучения слабовыраженных флуктуаций в скоростях роста микротрубочек, которые, как считают авторы, зависят от нуклеотидного состояния димеров тубулина на её конце. Такое же преимущество IRM по сравнению с флуоресцентной микроскопией было использовано в работе [47], где изучалась зависимость динамики микротрубочки от концентрации цитоплазматического раствора. IRM позволила провести более точные измерения быстрых скоростей деполимеризации микротрубочек при разных вязкостях раствора в условиях *in vitro*.

Изучение полимеризации тубулина архей также возможно с помощью IRM. В отличие от редких, прямых, плавно удлиняющихся микротрубочек из тубулина эукариот, тубулин Odin, как показано в работе [48] имеет тенденцию образовывать более широкие пучки нитей при аналогичных условиях.

На фоне большого количества преимуществ метода, недостатком является ограниченность зоны наблюдения микротрубочек сравнительно тонким слоем у поверхности стекла. Это проявляется в том, что при удалении микротрубочек вглубь раствора контрастность изображения теряется.

Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения

Безусловно, одним из наиболее популярных методов визуализации микротрубочек является флуоресцентная микроскопия. Стабилизированные микротрубочки могут

наблюдаться при помощи наиболее простых методов широкопольной флуоресцентной микроскопии, при условии, что на тубулины нанесены флуоресцентные метки, например, в виде малых органических красителей, флуоресцентно меченных анти-тубулиновых антител или белков, связывающих тубулины, или флуоресцентных белковых фрагментов, генетически присоединённых к тубулинам. Однако наблюдение динамической нестабильности подразумевает присутствие флуоресцентно-меченных тубулинов в растворе, которые создают существенный флуоресцентный фон, снижающий контраст изображения микротрубочек. Поэтому применяются методы, позволяющие собирать сигнал из довольно узкой зоны вокруг микротрубочек, и таким образом, значительно повышающие контраст. К таким методам относится конфокальная микроскопия и флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF). Последний метод является в настоящее время, возможно, наиболее распространённым

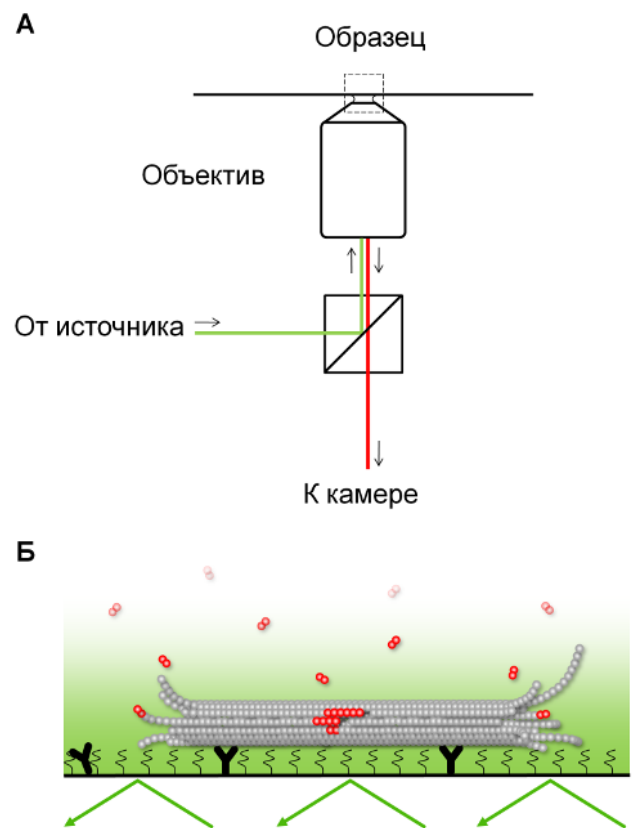


Рисунок 5. Принцип работы флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF-микроскопия). А) Оптическая схема флуоресцентного микроскопа. Возбуждающий флуоресценцию луч (зелёный) освещает образец через объектив. Сигнал флуоресценции (красный) отделяется от сигнала возбуждающего луча с помощью дихроического зеркала и фильтров, установленных в кубике. Б) Показано освещение образца возбуждающим лучом под углом полного внутреннего отражения и детектирование сигнала от флуоресцентного тубулина (красный), присоединяющегося к концам микротрубочки и непосредственно в её тело. Образец схематически представлен микротрубочкой, прикреплённой к заблокированной поверхности покровного стекла через антитела.

подходом для визуализации микротрубочек *in vitro*.

Метод TIRF-микроскопии (Рис. 5) позволяет изучать образцы в тонком слое (порядка 200 нм) вблизи поверхности покровного стекла. Для возбуждения флуоресценции образца свет должен пройти через границу между покровным стеклом и образцом. Обычно показатель преломления образца или среды, в которой он находится, меньше показателя преломления стекла. В таком случае складываются условия для возникновения явления полного внутреннего отражения, приводящие к тому, что луч, падающий на стекло под углами большими, чем угол полного внутреннего отражения, не проходит в среду с образцом. Тем не менее, экспоненциально затухающее электромагнитное поле обнаруживается в среде с образцом, причем его частота такая же, как у падающей волны. Применительно к микротрубочкам это позволяет изучать их в присутствии свободного флуоресцентно меченного тубулина и других молекул вблизи поверхности покровного стекла с высоким контрастом из-за отсутствия фона от толщи раствора.

Многочисленные примеры применения TIRF микроскопии для изучения динамики концов микротрубочек отражены в работе [49]. Я же в данном обзоре сосредоточусь на сравнительно недавнем применении этого метода для анализа феномена обмена тубулинов между телом микротрубочки и раствором [50-52]. Среди причин феномена такого встраивания ГТФ-тубулинов можно выделить повреждения решетки микротрубочки из-за механических деформаций изгиба, фотоиндуцированные дефекты, а так же дефекты, вызванные рассекающими микротрубочки ферментами. Кроме того, изменение количества протофиламентов в теле микротрубочки, а так же локальная смена типа её решетки присущи образующимся *in vitro* микротрубочкам. Тем не менее, внутри клетки эти явления каким-то образом могут контролироваться и регулироваться [53; 54].

В работах [55; 56] изучалось влияние дефектов в теле микротрубочки на её механические свойства. Было обнаружено, что жесткость микротрубочки уменьшается с каждым циклом изгиба её тела. В данном случае изгиб тела микротрубочки осуществлялся под действием потока раствора буфера в направлении, перпендикулярном оси микротрубочки. Подобно другим случаям усталости материала, концентрация механических напряжений в местах предсуществующих дефектов приводит к образованию более крупных повреждений, снижающих жесткость микротрубочек. Тем не

менее, в присутствии свободного ГТФ-тубулина поврежденные микротрубочки смогли включить новые димеры тубулина в свою решетку и восстановить первоначальную жесткость. Эти результаты показывают, что микротрубочки являются пластичными материалами со свойствами самовосстановления, то есть они обладают динамикой не только на своих концах. Такая пластичность решетки микротрубочек, как считается, позволяет им адаптироваться к механическим нагрузкам внутри клетки.

В работе [52] применение TIRF микроскопии в комбинации с электронной микроскопией позволило визуализировать встраивание тубулина из раствора в места дефектов, вызванных регуляторными белками спастин и катанин. На основе этого была выдвинута гипотеза, впервые объясняющая парадокс, связанный с рассекающими микротрубочки белками, о котором было сказано выше. Согласно ей, наноразмерные повреждения по всей длине микротрубочки, вызванные этими белками, могут спонтанно восстанавливаться за счет включения ГТФ-тубулина из раствора прямо в тело микротрубочки. Это, в свою очередь, приводит к её стабилизации. Кроме того, концы микротрубочек, появляющиеся в результате разрыва в местах дефектов, должны быть обогащены ГТФ-тубулином, что предотвращает их деполимеризацию в соответствии с теорией о ГТФ-шапке. В конечном счёте, считают авторы, стабилизация разорванных плюс-концов и более высокая частота восстановления всей микротрубочки синергируют, увеличивая количество и массу микротрубочек.

Возможная связь между структурными особенностями тела микротрубочки и её динамической нестабильностью рассматривается во многих работах для объяснения так называемого феномена «старения». Он заключается в том, что вероятность катастроф микротрубочек возрастает с увеличением времени её полимеризации [57; 58]. Кроме того, в недавней работе [59] проверена гипотеза о том, что дефекты решетки микротрубочки, связанные с переключением в ней количества протофиламентов, могут влиять на стабильность плюс-конца, приводя к его частым катастрофам. Для этого авторы полимеризовали микротрубочки в присутствии различных флуоресцентных веществ, которые, как известно по данным криоэлектронной микроскопии, способствуют образованию микротрубочек с различным числом протофиламентов. TIRF микроскопия позволила косвенным образом наблюдать наличие таких дефектов в теле микротрубочки в местах его взаимодействия с этими веществами.

Новые методы световой микроскопии микротрубочек

Как известно, один из основных недостатков флуоресцентной микроскопии связан с негативными эффектами самих флуоресцентных красителей, их фотообесцвечиванием и фототоксичными явлениями. Известно также, что флуоресцентно меченные микротрубочки при определённых условиях облучения способны разрушаться из-за образующихся свободных радикалов [60]. Поэтому сейчас возрастает интерес к развитиям нефлуоресцентных методов световой микроскопии. Кроме того, современные направления развития световой микроскопии в значительной степени представлены разработкой методов визуализации биологических образцов с субнанометровым разрешением. Воплощение обоих этих стремлений реализовано в методах ROCS (от англ. rotating coherent-scattering microscopy) и iSCAT (от англ. interferometric scattering microscopy).

ROCS микроскопия

Как известно, с одной стороны, косое освещение образца когерентным светом (например, лазером) позволяет добиться двукратного повышения разрешающей способности микроскопа по сравнению с нормальным падением света из-за более высоких порядков дифракции, собираемой объективом. С другой стороны, косое освещение когерентным светом приводит к слишком большому количеству артефактов интерференции и из-за этого, как считается, оно неприменимо в науках о жизни. Тем не менее, при вращении падающего лазерного луча на 360° во время одного цикла получения изображения удаётся реализовать некогерентное усреднение множества когерентных изображений, освещённых с разных направлений. Это, в свою очередь, позволяет разрешить структуры на расстоянии порядка четверти длины волны друг от друга, что недостижимо с помощью обычной (некогерентной) микроскопии. На этом принципе основана ROCS-микроскопия, которую авторы изобретения применили к исследованию микротрубочек [61]. Им удалось совместить ROCS микроскопию в тёмнопольном режиме детектирования сигнала от образца с оптической ловушкой для того, чтобы обеспечить сильный контраст для структур, удалённых от покровного стекла — изолированных микротрубочек — и изучить их механические свойства [62; 63].

По сравнению с тёмнопольной микроскопией, которая обеспечивает хороший контраст даже для слабо рассеивающих образцов, таких как актин или микротрубочки, а так же интерференционной микроскопией рассеянного света (iSCAT), о которой

написано ниже, ROCS имеет ряд технических преимуществ. Так, реализация тёмнопольной микроскопии на основе коммерчески доступных компонентов, например, с помощью специальной конденсорной линзы, может быть несовместима с некоторыми конструкциями оптических ловушек. В то же время, альтернативные подходы с использованием метода тёмного поля до сих пор были способны отображать только сильно рассеивающие частицы золота размером 50 нм. В свою очередь, iSCAT уже был применён для достижения высокоскоростного отслеживания одиночных микротрубочек с высокой точностью, однако этот метод ограничен небольшим осевым расстоянием вблизи поверхности покровного стекла [63].

iSCAT микроскопия

В своей простейшей форме iSCAT можно рассматривать как эквивалент IRM с лазерным освещением. Лазерный луч плотно фокусируется на образце, и падающий свет, частично отражённый на границе раздела подложка-вода, собирается вместе со светом, рассеянным образцом. При этом в большинстве постановок лазерный луч сканирует образец для получения растрового изображения [64]. В отличие от IRM, iSCAT позволяет достичь большей чувствительности за счёт использования источников когерентного света и оптимизированных методик обнаружения сигнала [62; 65].

Применение iSCAT микроскопии для отслеживания микротрубочек без использования флуоресцентных меток с высокой точностью (нм) и частотой кадров (килогерц) было продемонстрировано в работе [66]. Затем начали появляться работы, в которых этот метод использовался в различных целях. В работе [67] изучалась динамика микротрубочек, полимеризующихся из рекомбинантного тубулина, не обладающего способностью гидролизовать ГТФ. Подробная характеристика свойств этого тубулина с помощью iSCAT позволила установить критически важную роль кинетики гидролиза ГТФ не только в динамическом поведении микротрубочек, но и на стадии их нуклеации.

Впечатляющие эксперименты на основе iSCAT реализованы в работах [68] и [69] для изучения структуры растущих концов микротрубочек. В первом случае iSCAT позволил напрямую наблюдать встраивание димеров тубулина в тело микротрубочки с помощью золотых наночастиц размером 20 нм, ковалентно прикреплённых к молекулам рекомбинантного тубулина. Во второй работе визуализировались временные структурные изменения протофиламентов на кончике разбирающейся микротрубочки.

Авторы этой работы утверждают, что с помощью реализованного ими метода на основе iSCAT микроскопии удалось детектировать переход упорядоченных протофиламентов в неупорядоченную конформацию на кончике микротрубочки при её индуцированной разборке.

Атомно-силовая микроскопия микротрубочек

Внутри клетки контроль динамической нестабильности микротрубочек соответствующими ферментами, например, ассоциированными с ними деполимеразы, необходим для организации сложных комплексов из нескольких микротрубочек, таких как веретено деления или аксонемы. Обладая очевидными достоинствами, методы световой микроскопии, тем не менее, плохо применимы для изучения процессов, затрагивающих внутреннюю организацию микротрубочек, тем более, если микротрубочки не изолированы, а, как в клетке, собраны в пучки. Существующим методам оптической и электронной микроскопии не хватает пространственно-временного разрешения для наблюдения динамики отдельных микротрубочек внутри подобных пучков. Хотя, например, оптическая микроскопия и позволяет определить

количество микротрубочек в составе такого пучка, она, тем не менее, не способна разрешить их пространственно [9]. Применительно к этой задаче, как показано в работе [70]. АСМ можно считать тем инструментом, который позволяет заменить световую микроскопию в данном случае для успешного сопоставления процессов в нано- и микромасштабах.

Поэтому одним из немногих методов прямого наблюдения нанометровой структуры микротрубочек в естественных условиях, то есть в растворе буфера и при физиологических температурах, является атомно-силовая микроскопия (Рис. 6 А), которая активно развивается в настоящее время после изобретения в 1986 году [71]. В основе АСМ лежит простой принцип сканирования образца с помощью крошечного зонда, кантилевера, которое можно производить почти в любых условиях (в воздухе, в жидкости, при различных температурах и тд.), в том числе, тех, которые наиболее соответствуют естественным для биологического образца (то есть физиологическим). Основные стадии развития этого метода связаны с изобретением новых мод сканирования, среди которых основными являются контактная и динамическая (Рис. 6

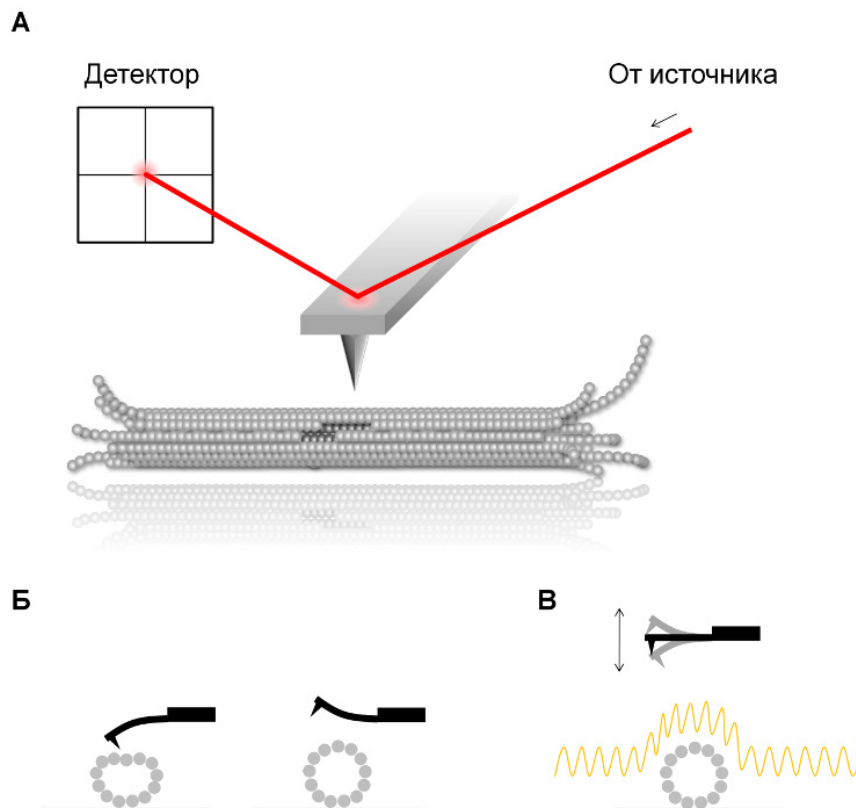


Рисунок 6. Принцип работы атомно-силового микроскопа. А) С помощью зонда (кантилевера), приводящегося в движение пьезоэлементом (или, наоборот, за счёт движение самого образца), происходит ощупывание образца. Сигнал взаимодействия кантилевера с образцом детектируется по отклонению лазерного луча. Б), В) Две основные моды работы АСМ – контактная (Б) и динамическая (В) – позволяют проводить измерения жесткости микротрубочек и визуализировать динамику их тела.

Б, В) [72]. Контактная мода (Рис. 6 Б) основана на поддержании постоянного отклонения кантилевера (и, следовательно, силы его взаимодействия с образцом) за счёт регулирования расстояния между ним и образцом с помощью системы обратной связи. Постоянный контакт между кантилевером и образцом позволяет получать топографическую картину с высоким пространственным разрешением. Однако нежелательным эффектом такого сканирования может быть нарушение структуры самого образца, и, в особенности, мягких биологических препаратов. Динамический (бесконтактный или полуконтактный) режим (Рис. 6 В) реализуется, когда кантилевер колеблется на резонансной (или близкой к ней) частоте. В зависимости от расстояния от образца частота колебания кантилевера меняется, что также позволяет измерять топографию, осуществляя амплитудную или частотную модуляцию с помощью системы обратной связи. Основное преимущество динамической моды по сравнению с контактной заключается в отсутствии непосредственного контакта с образцом. Относительно слабое взаимодействие с кантилевером не приводит к деформациям образца, почти не влияет на характеристики его поверхности и, следовательно, больше подходит для изучения биологических объектов. АСМ позволяет не только получать изображение рельефа образца с большим пространственным разрешением, но и измерять зависимость силы взаимодействия между кантилевером и образцом от расстояния между ними. Так называемая силовая кривая может дать ценную информацию о местных свойствах материала образца (эластичность, твердость, адгезия, плотность поверхностного заряда и т.д.) [73; 74]. Кроме того, режим построения силовой кривой может быть также использован для исследования топографии образца, и в ряде случаев имеет преимущества по сравнению с остальными модами, например, при реализации высокоскоростного сканирования [75].

Таким образом, основные возможности АСМ позволяют получать изображения образца с субнанометровым разрешением, контролируемо прикладывая к нему силы посредством кантилевера, измерять их, наблюдать за процессом деформации образца в результате такого воздействия и осуществлять наноманипуляции с ним. Выполнение этих действий производится одним кантилевером, поэтому для их последовательной реализации необходимо использование различных мод. На этой основе, например, техника наноиндентаций позволяет изучать упругие свойства микротрубочек [76-81]. Результаты измерений, проведённые в работе [81], демонстрируют большее значение жесткости для

микротрубочек, полимеризующихся в присутствии GMPCPP вместо ГТФ и таксола, что согласуется с данными, полученными с помощью оптической микроскопии и лазерной ловушки (выше).

Одно из основных направлений развития АСМ в настоящее время связано с реализацией методики быстрого АСМ, позволяющего наблюдать за молекулярными процессами в реальном времени. Сейчас, в зависимости от многих факторов, удаётся достичь скоростей сканирования образца порядка 1–12.5 кадров/секунду и пространственное разрешение 1–50 нм (а при некоторых условиях, например, при наблюдении мембранных белков, меньше 1 нм) [82]. На основе методики быстрого АСМ, разработанного в группе Андо, в работе [83] производилась визуализация дефектов в теле микротрубочки. В отличие от работы [80], в данном случае с помощью быстрого АСМ удалось наблюдать процесс самовосстановления решетки микротрубочки после воздействия на неё кантилевером с временным разрешением 500 мс.

Возможность наблюдения динамики тела микротрубочек на уровне отдельных протофиламентов с помощью АСМ впервые продемонстрирована в работах [70] и [82]. В работе [70] изучались молекулярные механизмы ремоделирования пучков из микротрубочек с помощью двух разных деполимераз: кинезина-8 Kip3p, и кинезина-13 MCAK. АСМ позволил установить, что, в отличие от Kip3p, MCAK вызывает разрушение тела микротрубочки в виде разрастающегося дефекта за счёт асинхронной деполимеризации протофиламентов.

Некоторые из нерешённых задач

Перечисленные экспериментальные методы изучения динамики микротрубочек в условиях *in vitro* эксперимента уже позволили ответить на широкий круг вопросов, охватывающих как саму природу динамической нестабильности микротрубочек, так и способов её регуляции. В настоящее время происходит углублённое исследование параметров динамической нестабильности микротрубочек. Основные нерешённые до конца вопросы связаны тем, как структура концов и тела микротрубочки, наличие в её регулярной решётке различного рода дефектов, взаимодействие с регуляторными молекулами, может влиять на поведение всей микротрубочки.

Например, до сих пор нет единого мнения относительно того, существуют ли спасения микротрубочек *in vitro* или нет. С момента появления первых работ по измерению параметров динамической нестабильности до

настоящего времени выходят работы, в которых спасения как наблюдаются [12; 15; 26-27; 29; 32; 84-88], так и не наблюдаются [19; 28; 33-34; 42; 58; 89-91]. С чем связана такая несогласованность экспериментальных данных пока остаётся неясным. Тем не менее, считается, что наличие ГТФ-тубулина в теле микротрубочки (в виде так называемых ГТФ-островков), например, за счёт его встраивания в места дефектов микротрубочки, может быть основным механизмом спасений. Там, где спасения наблюдаются, их частота значительно меньше частоты катастроф, то есть эти события являются относительно редкими. Поэтому, чтобы правильно охарактеризовать частоту спасений, необходимо, в первую очередь, набирать большую статистику периодов полимеризации и деполимеризации микротрубочек. Кроме этого, необходимы чёткие критерии того, какие события можно считать спасениями и катастрофами. Все эти особенности необходимо учитывать для правильного дизайна эксперимента, куда входит, в том числе, выбор метода микроскопии и метода обработки полученных данных. Набор большой статистики возможен как за счет увеличения времени съёмки микротрубочек, так и за счет выбора большего количества микротрубочек, однако в первом случае необходимо учитывать фоторазрушающие эффекты, появляющиеся, в том числе, при длительной экспозиции. Это, в свою очередь, диктует необходимость соблюдать тонкий баланс между временем съёмки и частотой кадров в единицу времени для того, чтобы, с одной стороны, избежать фоторазрушения микротрубочки, и, с другой стороны, чтобы не пропустить редкие события спасений. Вместе с этим, как показано нами *in vitro* ([92]), возможен учёт близости покровного стекла к микротрубочке и его непосредственной роли в появлении дефектов в теле микротрубочки, образовании ГТФ-островков и возникновении спасений. Кроме того, параметры динамической нестабильности плюс- и минус-концов микротрубочек, в том числе, их частоты спасений, отличаются из-за каких-то не известных до сих пор механизмов.

В работах [93-94] подчёркнута важность применения автоматизированных методов отслеживания динамических концов микротрубочек для того, чтобы можно было осуществить максимально подробный и беспристрастный анализ параметров динамической нестабильности микротрубочек. В свою очередь, применение современных нефлуоресцентных методов световой микроскопии (IRM, iSCAT) уже показало свою эффективность и приоритет по сравнению с флуоресцентной микроскопией на этом поприще.

Другие многочисленные нерешённые

задачи связаны с регуляцией динамики микротрубочек с помощью специальных молекул. В этой связи TIRF микроскопия во многом незаменима, потому что позволяет напрямую детектировать взаимодействие микротрубочек с регуляторными молекулами (ассоциированными с микротрубочками флуоресцентно мечеными белками или ингибиторами тубулина).

Применение атомно-силовой микроскопии для изучения микротрубочек открывает большие возможности для изучения их механических свойств, молекулярных механизмов динамической нестабильности и её регуляции. Очень перспективным выглядит использование АСМ для изучения многих вопросов, подобно работе [70], связанных с динамическим поведением микротрубочки в нанометровом масштабе. Особенно интересно это становится с развитием современных методов высокоскоростного АСМ, потому что взаимодействие молекул белка тубулина друг с другом и с другими молекулами характеризуется, в том числе, важными структурными изменениями, которые не удаётся подробно изучать с помощью световой микроскопии.

Заключение

Развитие методов оптической микроскопии определило возможности визуализации микротрубочек, что способствовало детальному исследованию их динамики, механики, и регуляции в течение последних десятилетий. За более чем 30-ти летний период изучения феномена динамической нестабильности микротрубочек можно засвидетельствовать важную историческую роль нефлуоресцентных методов, позволивших впервые наблюдать микротрубочки в динамике. Затем наступил расцвет эпохи флуоресцентной микроскопии, который ознаменовался широким распространением TIRF микроскопии для исследований микротрубочек, потеснившей традиционные методы темного поля и DIC микроскопии.

Интересным и вполне закономерным явлением можно считать возникновение новой волны интереса к нефлуоресцентным подходам на основе интерференционной микроскопии. Они привлекают исследователей свое простотой, свободой от артефактов флуоресцентных меток и от фотообесцвечивания (говоря о таких методах, как, например, IRM), а также очень высокой чувствительностью, вплоть до возможности детектировать встраивания в микротрубочки отдельных молекул тубулина (iSCAT). Вместе с этим, многообещающим подходом для визуализации тела и конца микротрубочек

является атомно-силовая микроскопия, которая быстро развивается в сторону высокоскоростной визуализации динамики отдельных белковых комплексов.

Благодарности

Автор благодарен Гудимчуку Никите Борисовичу за критическое прочтение данной статьи и предложенные им идеи по структуре текста и рисункам. Анисимов Михаил Николаевич является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС». Работа была поддержана междисциплинарной научно-образовательной школой Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

Конфликт интересов

Автор заявляет отсутствие конфликтов интересов

Список литературы

1. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984;312:237–42. <https://doi.org/10.1038/312237a0>.
2. Grishchuk EL, Molodtsov MI, Ataulakhanov FI, McIntosh JR. Force production by disassembling microtubules. *Nature* 2005;438:384–8. <https://doi.org/10.1038/nature04132>.
3. Gudimchuk NB, McIntosh JR. Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021;22:777–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00399-x>.
4. Gudimchuk NB, Ulyanov E V, Toole EO, Page CL, Vinogradov DS, Morgan G, et al. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography. *Nature Communications* n.d.:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17553-2>.
5. Jordan MA, Wilson L. Microtubules As a Target for 2004;4. <https://doi.org/10.1038/nr1317>.
6. Slautterback F, Ledbetter A. From the Archive Microtubules get a name. *Jcb* 2005;168:852–3.
7. Manka SW, Moores CA. Microtubule structure by cryo-EM: Snapshots of dynamic instability. *Essays in Biochemistry* 2018;62:737–51. <https://doi.org/10.1042/EBC20180031>.
8. Nogales E, Zhang R. Visualizing microtubule structural transitions and interactions with associated proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 2016;37:90–6. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.12.009>.
9. Tran P, Salmon ED, Oldenbourg R. Quantifying single and bundled microtubules with the polarized light microscope. *The Biological Bulletin* 1995;189:206. <https://doi.org/10.1086/BBLv189n2p206>.
10. Gutiérrez-Medina B, Block SM. Visualizing individual microtubules by bright field microscopy. *American Journal of Physics* 2010;78:1152–9. <https://doi.org/10.1119/1.3453264>.

11. Gell C, Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, et al. Microtubule dynamics reconstituted in vitro and imaged by single-molecule fluorescence microscopy. vol. 95. First edit. Elsevier; 2010. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)95013-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)95013-9).
12. Horio T, Hotani H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 1986;321:605–7. <https://doi.org/10.1038/321605a0>.
13. Miki-Noumura T, Kamiya R. Shape of microtubules in solutions. *Experimental Cell Research* 1976;97:451–3. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90642-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90642-X).
14. Hotani H, Horio T. Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1988;10:229–36. <https://doi.org/10.1002/cm.970100127>.
15. Tran PT, Walker RA, Salmon ED. A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *Journal of Cell Biology* 1997;138:105–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.1.105>.
16. Mizushima-Sugano J, Maeda T, Miki-Noumura T. Flexural rigidity of singlet microtubules estimated from statistical analysis of their contour lengths and end-to-end distances. *BBA - General Subjects* 1983;755:257–62. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(83\)90212-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(83)90212-X).
17. Takasone T, Juodkazis S, Kawagishi Y, Yamaguchi A, Matsuo S, Sakakibara H, et al. Flexural rigidity of a single microtubule. *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers* 2002;41:3015–9. <https://doi.org/10.1143/jjap.41.3015>.
18. Minoura I, Muto E. Dielectric measurement of individual microtubules using the electroorientation method. *Biophysical Journal* 2006;90:3739–48. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071324>.
19. Itoh TJ, Hotani H. Microtubule-Stabilizing Activity of Microtubule-Associated Proteins (MAPs) Is Due to Increase in Frequency of Rescue in Dynamic Instability: Shortening Length Decreases with Binding of MAPs onto Microtubules. *Cell Structure and Function* 1994;19:279–90. <https://doi.org/10.1247/csf.19.279>.
20. Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of τ Protein and Interactions with Microtubules. *Biochemistry* 1994;33:9511–22. <https://doi.org/10.1021/bi00198a017>.
21. Spector JO, Vemu A, Roll-Mecak A. In Vitro Microtubule Dynamics Assays Using Dark-Field Microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 2020;2101:39–51. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0219-5_4.
22. Allen RD, Travis JL, Allen NS, Yilmaz H. Video-enhanced contrast polarization (AVEC-POL) microscopy: A new method applied to the detection of birefringence in the motile reticulopodial network of *allogromia laticollaris*. *Cell Motility* 1981;1:275–89. <https://doi.org/10.1002/cm.970010302>.
23. Allen RD, Allen NS, Travis JL. Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: A new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *allogromia laticollaris*. *Cell Motility* 1981;1:291–302. <https://doi.org/10.1002/cm.970010303>.

24. Inoue S. Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polarization-based microscopy. *Journal of Cell Biology* 1981;89:346–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.2.346>.
25. Salmon ED. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends in Cell Biology* 1995;5:154–8. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)88979-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)88979-5).
26. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, et al. Dynamic Instability of Individual Microtubules. *The Journal of Cell Biology* 1988;107:1437–48.
27. Walker RA, Inoué S, Salmon ED. Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro. *Collected Works of Shinya Inoue: Microscopes, Living Cells, and Dynamic Molecules* 2008;108:649–56. https://doi.org/10.1142/9789812790866_0048.
28. Moore RC, Zhang M, Cassimeris L, Cyr RJ. In vitro assembled plant microtubules exhibit a high state of dynamic instability. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1997;38:278–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)38:3<278::AID-CM6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)38:3<278::AID-CM6>3.0.CO;2-1).
29. O'Brien ET, Salmon ED, Walker RA, Erickson HP. Effects of Magnesium on the Dynamic Instability of Individual Microtubules. *Biochemistry* 1990;29:6648–56. <https://doi.org/10.1021/bi00480a014>.
30. Müller-Reichert T, Chrétien D, Severin F, Hyman AA. Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: Information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (α,β)methylenediphosphonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:3661–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3661>.
31. Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, et al. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Human Molecular Genetics* 1999;8:1599–610. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.9.1599>.
32. Vasquez RJ, Gard DL, Cassimeris L. XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *Journal of Cell Biology* 1994;127:985–93. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.985>.
33. Podolski M, Mahamdeh M, Howard J. Stu2, the budding yeast XMAP215/Dis1 homolog, promotes assembly of yeast microtubules by increasing growth rate and decreasing catastrophe frequency. *Journal of Biological Chemistry* 2014;289:28087–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.584300>.
34. Kinoshita K, Arnal I, Desai A, Drechsel DN, Hyman AA. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 2001;294:1340–3. <https://doi.org/10.1126/science.1064629>.
35. Kikumoto M, Kurachi M, Tosa V, Tashiro H. Flexural rigidity of individual microtubules measured by a buckling force with optical traps. *Biophysical Journal* 2006;90:1687–96. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.055483>.
36. Curtis ASG. The Mechanism of Adhesion of Cells To Glass. *Journal of Cell Biology* 1964;20:199–215. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.2.199>.
37. Park JS, Lee IB, Moon HM, Joo JH, Kim KH, Hong SC, et al. Label-free and live cell imaging by interferometric scattering microscopy. *Chemical Science* 2018;9:2690–7. <https://doi.org/10.1039/c7sc04733a>.
38. Triclin S, Inoue D, Gaillard J, Htet ZM, DeSantis ME, Portran D, et al. Self-repair protects microtubules from destruction by molecular motors. *Nature Materials* 2021;20:883–91. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00905-0>.
39. Mahamdeh M, Howard J. Implementation of interference reflection microscopy for label-free, high-speed imaging of microtubules. *Journal of Visualized Experiments* 2019;2019:1–8. <https://doi.org/10.3791/59520>.
40. Mahamdeh M, Simmert S, Luchniak A, Schäffer E, Howard J. Label-free high-speed wide-field imaging of single microtubules using interference reflection microscopy. *Journal of Microscopy* 2018;272:60–6. <https://doi.org/10.1111/jmi.12744>.
41. Tuna Y, Al-hiyasat A, Howard J. Imaging Dynamic Microtubules and Associated Proteins by Simultaneous Interference-Reflection and Total-Internal-Reflection-Fluorescence Microscopy n.d.
42. Kuo YW, Trottier O, Mahamdeh M, Howard J. Spastin is a dual-function enzyme that severs microtubules and promotes their regrowth to increase the number and mass of microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019;116:5533–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818824116>.
43. Kuo Y-W, Mahamdeh M, Tuna Y, Howard J. The force required to remove tubulin from the microtubule lattice. *BioRxiv* 2022.
44. Ciorîță A, Bugiel M, Sudhakar S, Schäffer E, Jannasch A. Single depolymerizing and transport kinesins stabilize microtubule ends. *Cytoskeleton* 2021;78:177–84. <https://doi.org/10.1002/cm.21681>.
45. Chen J, Kholina E, Szyk A, Fedorov VA, Kovalenko I, Gudimchuk N, et al. A-Tubulin Tail Modifications Regulate Microtubule Stability Through Selective Effector Recruitment, Not Changes in Intrinsic Polymer Dynamics. *Developmental Cell* 2021;56:2016–2028.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.05.005>.
46. Cleary JM, Kim T, Cook A (Zeke), Hancock WO, Rice LM. Measurements and simulations of microtubule growth imply strong longitudinal interactions and reveal a role for GDP on the elongating end. *Biophysical Journal* 2022;121:521a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.2743>.
47. Molines AT, Lemièrre J, Gazzola M, Steinmark IE, Edrington CH, Hsu CT, et al. Physical properties of the cytoplasm modulate the rates of microtubule polymerization and depolymerization. *Developmental Cell* 2022;57:466–479.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.001>.
48. Akil C, Ali S, Tran LT, Gaillard J, Li W, Hayashida K, et al. Structure and dynamics of *Odinarchaeota* tubulin and the implications for eukaryotic microtubule evolution. *Science Advances* 2022;8:1–13. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm2225>.
49. Zwetsloot AJ, Tut G, Straube A. Measuring microtubule dynamics. *Essays in Biochemistry* 2018;62:725–35. <https://doi.org/10.1042/EBC20180035>.
50. Aumeier C, Schaedel L, Gaillard J, John K, Blanchoin L, Théry M. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nature Cell Biology* 2016;18:1054–64. <https://doi.org/10.1038/ncb3406>.
51. de Forges H, Pilon A, Cantaloube I, Pallandre A, Haghiri-Gosnet AM, Perez F, et al. Localized Mechanical

- Stress Promotes Microtubule Rescue. *Current Biology* 2016;26:3399–406. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.048>.
52. Vemu A, Szczesna E, Zehr EA, Spector JO, Grigorieff N, Deaconescu AM, et al. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science* 2018;361. <https://doi.org/10.1126/science.aau1504>.
53. Chaaban S, Brouhard GJ. A microtubule bestiary: Structural diversity in tubulin polymers. *Molecular Biology of the Cell* 2017;28:2924–31. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0271>.
54. Guyomar C, Ku S, Heumann J, Bousquet C, Guilloux G, Gaillard N, et al. Structural heterogeneity of the microtubule lattice. *BioRxiv* 2021:2021.07.14.452321.
55. Schaedel L, Triclin S, Chrétien D, Abrieu A, Aumeier C, Gaillard J, et al. Lattice defects induce microtubule self-renewal. *Nature Physics* 2019;15:830–8. <https://doi.org/10.1038/s41567-019-0542-4>.
56. Schaedel L, John K, Gaillard J, Nachury M V. Europe PMC Funders Group Microtubules self-repair in response to mechanical stress 2016;14:1156–63. <https://doi.org/10.1038/nmat4396>. Microtubules.
57. Odde DJ, Cassimeris L, Buettner HM. Kinetics of microtubule catastrophe assessed by probabilistic analysis. *Biophysical Journal* 1995;69:796–802. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)79953-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)79953-2).
58. Gardner MK, Zanic M, Gell C, Bormuth V, Howard J. Depolymerizing kinesins Kip3 and MCAK shape cellular microtubule architecture by differential control of catastrophe. *Cell* 2011;147:1092–103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.037>.
59. Rai A, Liu T, Katrukha EA, Estevez-Gallego J, Manka SW, Paterson I, et al. Lattice defects induced by microtubule-stabilizing agents exert a long-range effect on microtubule growth by promoting catastrophes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2021;118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112261118>.
60. Guo H, Xu C, Liu C, Qu E, Yuan M, Li Z, et al. Mechanism and dynamics of breakage of fluorescent microtubules. *Biophysical Journal* 2006;90:2093–8. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071209>.
61. Jünger F, Olshausen P V., Rohrbach A. Fast, label-free super-resolution live-cell imaging using rotating coherent scattering (ROCS) microscopy. *Scientific Reports* 2016;6:1–18. <https://doi.org/10.1038/srep30393>.
62. Priest L, Peters JS, Kukura P. Scattering-based Light Microscopy: From Metal Nanoparticles to Single Proteins. *Chemical Reviews* 2021;121:11937–70. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00271>.
63. Koch MD, Rohrbach A. Label-free Imaging and Bending Analysis of Microtubules by ROCS Microscopy and Optical Trapping. *Biophysical Journal* 2018;114:168–77. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.036>.
64. Ortega-Arroyo J, Kukura P. Interferometric scattering microscopy (iSCAT): New frontiers in ultrafast and ultrasensitive optical microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2012;14:15625–36. <https://doi.org/10.1039/c2cp41013c>.
65. Ortega Arroyo J, Andrecka J, Spillane KM, Billington N, Takagi Y, Sellers JR, et al. Label-free, all-optical detection, imaging, and tracking of a single protein. *Nano Letters* 2014;14:2065–70. <https://doi.org/10.1021/nl500234t>.
66. Andrecka J, Ortega Arroyo J, Lewis K, Cross RA, Kukura P. Label-free Imaging of Microtubules with Sub-nm Precision Using Interferometric Scattering Microscopy. *Biophysical Journal* 2016;110:214–7. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.055>.
67. Roostalu J, Thomas C, Cade NI, Kunzelmann S, Taylor IA, Surrey T. The speed of GTP hydrolysis determines GTP cap size and controls microtubule stability. *eLife* 2020;9:1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.51992>.
68. Mickolajczyk KJ, Geyer EA, Kim T, Rice LM, Hancock WO. Direct observation of individual tubulin dimers binding to growing microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019;201815823. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815823116>.
69. Vala M, Bujak Ł, García Marín A, Holanová K, Henrichs V, Braun M, et al. Nanoscopic Structural Fluctuations of Disassembling Microtubules Revealed by Label-Free Super-Resolution Microscopy. *Small Methods* 2021;5. <https://doi.org/10.1002/smt.202000985>.
70. S. WS, F. MM, S. TJ, Radhika S. Atomic force microscopy reveals distinct protofilament-scale structural dynamics in depolymerizing microtubule arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2022;119:e2115708119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115708119>.
71. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 1986;56:930–3. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
72. Dufrêne YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology* 2017;12:295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>.
73. Liu S, Wang Y. Application of AFM in microbiology: A review. *Scanning* 2010;32:61–73. <https://doi.org/10.1002/sca.20173>.
74. Butt HJ, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* 2005;59:1–152. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
75. Nievergelt AP, Banterle N, Andany SH, Gönczy P, Fantner GE. High-speed photothermal off-resonance atomic force microscopy reveals assembly routes of centriolar scaffold protein SAS-6. *Nature Nanotechnology* 2018;13:696–701. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0149-4>.
76. Kasas S, Dietler G. Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2008;456:13–27. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0448-y>.
77. Vinckier A, Heyvaert I, D'Hoore A, McKittrick T, Van Haesendonck C, Engelborghs Y, et al. Immobilizing and imaging microtubules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 1995;57:337–43. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(94\)00194-R](https://doi.org/10.1016/0304-3991(94)00194-R).
78. Kis A, Kasas S, Babić B, Kulik AJ, Benoît W, Briggs GAD, et al. Nanomechanics of Microtubules. *Physical Review Letters* 2002;89:1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.89.248101>.
79. de Pablo PJ, Schaap IAT, MacKintosh FC, Schmidt CF. Deformation and Collapse of Microtubules on the Nanometer Scale. *Physical Review Letters* 2003;91:1–

4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.91.098101>.
80. Schaap IAT, Carrasco C, De Pablo PJ, MacKintosh FC, Schmidt CF. Elastic response, buckling, and instability of microtubules under radial indentation. *Biophysical Journal* 2006;91:1521–31. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.077826>.
81. Munson KM, Mulugeta PG, Donhauser ZJ. Enhanced mechanical stability of microtubules polymerized with a slowly hydrolyzable nucleotide analogue. *Journal of Physical Chemistry B* 2007;111:5053–7. <https://doi.org/10.1021/jp0716637>.
82. Fukuda S, Ando T. Faster high-speed atomic force microscopy for imaging of biomolecular processes. *Review of Scientific Instruments* 2021;92. <https://doi.org/10.1063/5.0032948>.
83. Ganser C, Uchihashi T. Microtubule self-healing and defect creation investigated by in-line force measurements during high-speed atomic force microscopy imaging. *Nanoscale* 2019;11:125–35. <https://doi.org/10.1039/c8nr07392a>.
84. Fygenon DK, Braun E, Libchaber A. 2011-13 2011;50:1–13.
85. Billger MA, Bhattacharjee G, Williams RC. Dynamic instability of microtubules assembled from microtubule-associated protein-free tubulin: Neither variability of growth and shortening rates nor “rescue” requires microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 1996;35:13656–63. <https://doi.org/10.1021/bi9616965>.
86. Vitre B, Coquelle FM, Heichette C, Garnier C, Chrétien D, Arnal I. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature Cell Biology* 2008;10:415–21. <https://doi.org/10.1038/ncb1703>.
87. Tropini C, Roth EA, Zanic M, Gardner MK, Howard J. Islands containing slowly hydrolyzable GTP analogs promote microtubule rescues. *PLoS ONE* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030103>.
88. Fees CP, Moore JK. A unified model for microtubule rescue. *Molecular Biology of the Cell* 2019;30:753–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-08-0541>.
89. Chrétien D, Fuller SD, Karsenti E. Structure of growing microtubule ends: Two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *Journal of Cell Biology* 1995;129:1311–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.5.1311>.
90. Tran PT, Joshi P, Salmon ED. How tubulin subunits are lost from the shortening ends of microtubules. *Journal of Structural Biology* 1997;118:107–18. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3844>.
91. Al-Bassam J, Kim H, Brouhard G, van Oijen A, Harrison SC, Chang F. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Developmental Cell* 2010;19:245–58. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.016>.
92. 13(th) EBSA congress, July 24-28, 2021, Vienna, Austria. *European Biophysics Journal : EBJ* 2021;50:1–226. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01558-w>.
93. Mahserejian SM, Scripture JP, Mauro AJ, Lawrence EJ, Jonasson EM, Murray KS, et al. Quantification of microtubule stutters: dynamic instability behaviors that are strongly associated with catastrophe. *Molecular Biology of the Cell* 2022;33:ar22. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-06-0348>.
94. Demchouk AO, Gardner MK, Odde DJ. Microtubule

tip tracking and tip structures at the nanometer scale using digital fluorescence microscopy. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2011;4:192–204. <https://doi.org/10.1007/s12195-010-0155-6>.